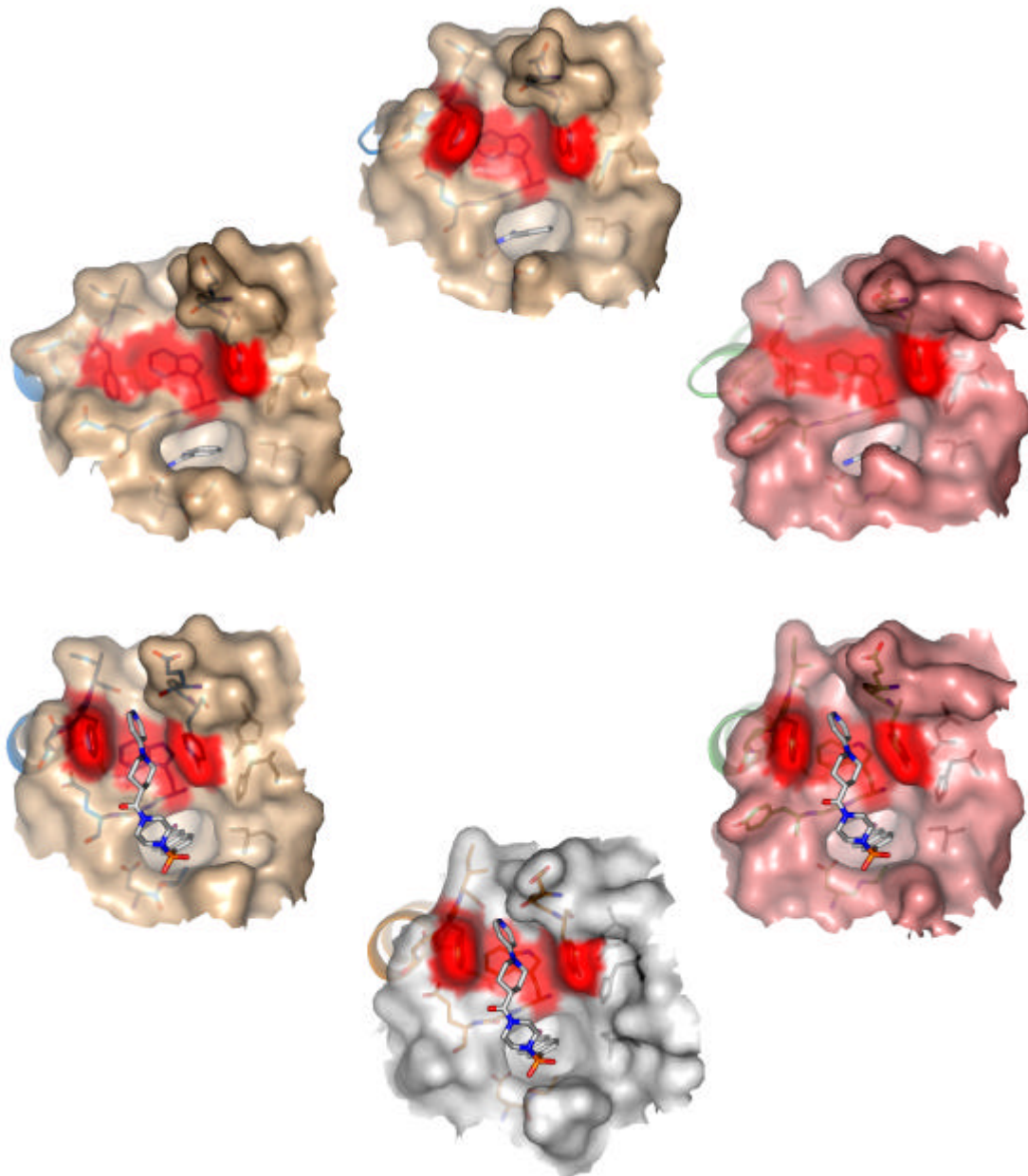


**Überführung der Faktor Xa Bindetasche in Trypsin:
Ein Modellsystem für das Verständnis von
Protein – Ligand – Wechselwirkungen und zur
Charakterisierung von Selektivitätsdeterminanten**



Daniel Rauh
aus Frankfurt am Main

**Überführung der Faktor Xa Bindetasche in Trypsin:
Ein Modellsystem für das Verständnis von
Protein – Ligand – Wechselwirkungen und zur
Charakterisierung von Selektivitätsdeterminanten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

vorgelegt von

Daniel Rauh
aus Frankfurt am Main

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen:

04. März 2003

Erstgutachter:

PROF. DR. G. KLEBE

Zweitgutachter:

PROF. DR. M. T. STUBBS

Drittgutachter:

PROF. DR. DR. H. C. R. HUBER

Tag der mündlichen Prüfung:

04. März 2003

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn PROF. DR. G. KLEBE und PROF. DR. M. T. STUBBS am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Januar 2000 bis Dezember 2002 durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt:

- Herrn PROF. DR. G. KLEBE für die interessante Aufgabenstellung und besonders für die Möglichkeit, das Gebiet des rationalen Wirkstoffdesigns in seiner Vielfalt und auch aus kritischer Perspektive kennenzulernen.
- Herrn PROF. DR. M. T. STUBBS für das entgegengebrachte Vertrauen, die Möglichkeit der völlig freien Entfaltung meiner Ideen, der stetigen Diskussion sowie der Verbesserung meiner Englischkenntnisse.
- Frau DR. SABINE REYDA für ihre Einführung in die Geheimnisse der Mikrobiologie.
- Herrn CHRISTIAN SOHN für die ständige Betreuung des Röntgengenerators und für die zahlreichen Anregungen bei technischen Fragestellungen.
- Herrn Apotheker CHRISTOF WERNER für die Diskussion kristallographischer Fragestellungen.
- Herrn TORSTEN LUKSCH für das tatkräftige Mitwirken bei der Produktion der *finalen* Trypsinvarianten.
- Frau DR. JENNIFER HARRIS für die großzügige Unterstützung während des Forschungsaufenthaltes am GNF in La Jolla, Kalifornien.
- Herrn Apotheker HANS VELEC für sein administratives Geschick.
- Herrn Apotheker DANIEL KUHN für die Suche in Datenbanken.
- Frau Apothekerin ANASTASIA TZIRIDIS für das Korrekturlesen.
- Herrn DR. T. KÄMPCHEN für die bereitwillige Versorgung mit Computer-Hardware.
- Den Apothekerinnen DR. DAGMAR FISCHER und CHRISTINE OSTER für das Lyophilisieren der Trypsinvarianten.
- Herrn PROF. DR. R. MATUSCH sowie dessen Arbeitskreis für das großzügige Überlassen von Laborgeräten.

- Den Literaturarbeitern TOBIAS ROGOSCH und JAN STAMPFUß für ihre Mitarbeit.
- DR. JÖRG STÜRZEBECKER für die Bereitstellung von Inhibitoren.
- Den Herren DR. GLEB BOURENKOV und DR. HANS BARTUNIK der MPI *Beamline* BW6 am DESY in Hamburg für ihre Hilfe bei der Datensammlung.
- Den Mitgliedern des Arbeitskreises Klebe sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg für die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Dem Graduiertenkolleg „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“ der DFG.
- Frau Apothekerin EVA GRÖNE für ihre unerschöpfliche Toleranz.

1	Einleitung	1
1.1	Das Verständnis von Selektivität und Spezifität bei Protein-Ligand-Wechselwirkungen – Herausforderung für das moderne Wirkstoffdesign	2
1.2	Der Prozess der Wirkstofffindung.....	3
1.3	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign.....	5
1.3.1	Affinität, das Resultat aus dem Zusammenspiel von Entropie und Enthalpie	9
1.4	Das Modellsystem	14
1.4.1	Faktor Xa als Zielprotein für das Wirkstoffdesign	14
1.4.2	Struktur und Aktivität von Faktor Xa	15
1.4.3	Trypsin als Modell für Faktor Xa	15
1.4.4	Proteinstruktur und Spezifität von Trypsin	16
1.4.5	Experimentelle Methoden zur Selektivitätsfrage.....	18
1.4.6	Aufgabenstellung – Trypsinvarianten für das Verständnis von Selektivitätsdeterminanten in Protein-Ligand-Wechselwirkungen.....	19
1.4.7	Verfahren zur Herstellung von Trypsinvarianten in ausreichender Menge für kinetische und kristallographische Charakterisierungen	21
2	Methoden	25
2.1	Hochdurchsatzmethode zum Auffinden bzw. Optimieren von Bedingungen für die in vitro Proteinfaltung	25
2.2	Puls-Renaturierung	27
3	Ergebnisse und Diskussion.....	28
3.1	Trypsin Mutants for Structure-Based Drug Design: Expression, Refolding and Crystallisation	29
3.1.1	Abstract:	29
3.1.2	Introduction.....	30
3.2	ZZ made EZ: Influence of inhibitor configuration on enzyme selectivity.....	39
3.2.1	Abstract	39
3.2.2	Introduction.....	40
3.2.3	Materials and Methods.....	42
3.2.4	Results and Discussion	45

3.2.5	Conclusions	51
3.2.6	Acknowledgements	52
3.3	Understanding protein-ligand interactions: Role of protein plasticity	53
3.3.1	Abstract	53
3.3.2	Introduction.....	54
3.3.3	Results	56
3.3.4	Discussion.....	68
3.3.5	Conclusions	71
3.3.6	Materials and Methods.....	74
3.3.7	Acknowledgements	76
3.4	Röntgenkristallstrukturen der Trypsinvarianten mit Aprotinin.....	77
3.5	Untersuchungen zur Substratspezifität der Trypsinvarianten	82
3.5.1	Veränderte Substratspezifität des Trypsins in P1 durch A190.....	83
3.5.2	Die 99-Schleife als Determinante für die P2-Spezifität von Faktor Xa.....	84
4	Vergleichende Aspekte der Diskussion und Perspektive	85
5	Zusammenfassung	91
6	Anhang.....	95
7	Literaturverzeichnis.....	97
	Erklärung.....	110
	Lebenslauf	111

1 Einleitung

Ausgehend von den pharmazeutischen Disziplinen, wegweisend durch Pharmakologen und klinischer Prüfung hat im vergangenen Jahrhundert nichts die medizinischen Therapie-Möglichkeiten so nachhaltig geprägt wie die Wirkstoffforschung (Drews, 2000). Bereits 1874 postulierte Paul Ehrlich als Student in Straßburg die Existenz von Chemorezeptoren. Emil Fischer legte mit seiner „Schlüssel und Schlosstheorie“ den Grundstein für das heutige Verständnis der Arzneimittelwirkung. Langley formulierte 1905 ein funktionelleres Konzept, in dem er einen Rezeptor mit einem Schalter assoziierte, der spezifische Signale generiert oder empfängt und durch Antagonisten blockiert bzw. durch Agonisten aktiviert wird. Dies geschah Jahrzehnte bevor, die erste dreidimensionale Struktur eines Proteins (*Rezeptor, Schloss*) im Komplex mit seinem Liganden (*Agonist, Antagonist, Schlüssel*) aufgeklärt wurde. Waren dies die Pionierjahre der Wirkstoffforschung, so befinden wir uns heute mit der Kartierung des menschlichen Genoms (Lander, 2001; Venter *et al.*, 2001) erneut an der Schwelle einer Ära, welche die Forschung in den Biowissenschaften tiefgreifend verändern wird (Nature Structural Biology, 2000).

Das Aufkommen der Molekularbiologie, insbesondere der Genetik, hat einen großen Einfluss auf die Wirkstoffforschung. Rekombinante Proteine und monoklonale Antikörper haben in brillanter Art und Weise das Arsenal an Therapeutika bereichert. Genetiker in Zusammenarbeit mit Bioinformatikern ermöglichen uns heute, die genetischen Grundlagen komplexer Krankheitsentstehung zu verstehen und die Angriffspunkte der zukünftigen Medizin bei einer Erweiterung der Behandlungsmöglichkeiten zu definieren. Die gestiegene Komplexität im Bereich der Wirkstoffforschung erfordert einen Paradigmenwechsel in der pharmazeutischen Forschung hin zu interdisziplinären Ansätzen. Die Biotechnologie hat sich dabei als Bindeglied zwischen akademischen Ansätzen und der industriellen Umsetzung erwiesen. Nur so lassen sich die Herausforderungen der Medizin der Zukunft angehen, um zu neuen Lösungen im Interesse des Menschen zu gelangen.

Mit der vollständigen Sequenzierung des humanen Genoms eröffnet sich die große Herausforderung der Charakterisierung der menschlichen Genprodukte, den Proteinen (Blundell & Mizuguchi, 2000; Celis *et al.*, 2000; Hoang *et al.*, 2001; Mizuguchi *et al.*, 2001; Pandey & Mann, 2000). Ausgehend von den Erkenntnissen der Strukturbiologie hat sich zunehmend die Überzeugung manifestiert, dass erst die Kenntnis der räumlichen und elektronischen Struktur der in den Genen kodierten Proteine es erlaubt, Lebensvorgänge

auf molekularer Ebene zu verstehen (Thornton *et al.*, 2000). Den modern Pharmazeuten interessieren dabei speziell pathophysiologische Vorgänge, da sich mit der Charakterisierung der Zielproteine Möglichkeiten eröffnen, strukturbasiert Wirkstoffmoleküle in dem funktionellen Kontext maßzuschneidern (Russell & Eggleston, 2000).

1.1 Das Verständnis von Selektivität und Spezifität bei Protein-Ligand-Wechselwirkungen – Herausforderung für das moderne Wirkstoffdesign

Physiologisch liegen die angesprochenen Rezeptoren oftmals räumlich getrennt in verschiedenen Kompartimenten vor. So erfüllen z.B. Dopaminrezeptoren im Zentralnervensystem eine andere Aufgabe als peripher gelegene Rezeptoren des gleichen Typs. Durch die systemische Applikation von Pharmaka, wie z.B. eines Dopaminrezeptor-Agonisten oder Antagonisten und der gewünschten zentralen Wirkung, wird so schnell eine unerwünschte Arzneimittelwirkung ausgelöst (UAW).

Besonders bei Pharmaka, die an Rezeptoren (Zielprotein) binden, die mit einer Reihe von Subtypen assoziiert sind, wie z.B. Serotonin-, Dopamin-, Histamin- oder Opioid-Rezeptoren, steht oftmals die subtypspezifische Adressierung des Rezeptors und damit die Selektivität im Mittelpunkt. Ein Beispiel von selektiven Substanzen klinischer Relevanz sind Pharmaka, die an β -Rezeptoren binden. Derzeit wird physiologisch zwischen drei β -Rezeptorsubtypen unterschieden. β_1 -Rezeptoren sind anatomisch vorwiegend im Bereich des Herzens, der Niere und des Gastrointestinaltrakts lokalisiert. β_2 -Rezeptoren findet man im Bronchialtrakt sowie in der glatten Gefäßmuskulatur. Der β_3 -Rezeptor ist hingegen in der Leber, den Fettzellen sowie im Pankreas lokalisiert und mit Stoffwechselreaktionen wie z.B. einer Verstärkung der Glykogenolyse, Lipolyse und Insulinfreisetzung assoziiert.

Aufgrund der verschiedenen Subtypen und deren unterschiedlicher anatomischer Lokalisation ergeben sich durch das Stimulieren bzw. Antagonisieren von β -Rezeptoren eine Reihe von physiologischen Wirkungen. Eine nichtselektive Blockade aller β -adrenerger Rezeptoren, beispielsweise durch Propranolol, bewirkt neben den gewünschten Wirkungen auf das kardiovaskuläre System auch eine Reihe unerwünschter Wirkungen klinischer Relevanz, z.B. periphere Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion,

Störungen des Glucosestoffwechsels. Heute stehen β -Rezeptorsubtypselektive Pharmaka im Mittelpunkt der Therapie von Hypertonie (Bisoprolol¹), Herzinsuffizienz (Carvedilol²), Asthma bronchiale (Fenoterol³) etc.

Auch führt die unterschiedliche Wirkung von Pharmaka in Abhängigkeit von deren Konzentration am Rezeptor zu interessanten Effekten. Wie bei anderen Neurotransmitter-Rezeptoren wird auch bei den Opioid-Rezeptoren zwischen verschiedenen Subtypen unterschieden. Einzelne Subtypen werden als μ -, κ - und δ -Rezeptoren bezeichnet. μ -Rezeptoren sind vor allem für die durch Opiate ausgelöste supraspinale Analgesie, Atemdepression und physische Abhängigkeit verantwortlich. Eine Erregung von κ -Rezeptoren ruft neben Analgesie und Miosis auch Sedation hervor, während Stimulation von δ -Rezeptoren zusätzlich Dysphorie und Halluzination zuzufolge hat. Morphin als Agonist der Opioid-Rezeptoren assoziiert je nach Konzentration eine überwiegend analgetische, halluzinogene, sedative oder atemdepressive Wirkung.

Diese Beispiele zeigen, dass Fragen zur Selektivität und Spezifität bei der Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen unausweichlich für das tiefgreifende Verständnis von *Actio* und *Reactio* von Wirkstoffen und die Entwicklung moderner Pharmaka sind.

1.2 Der Prozess der Wirkstofffindung

Historisch war der Steinkohlenteer als Abfallprodukt der Industrialisierung des ausgehenden 19ten Jahrhunderts, die Fundgrube für aliphatische und aromatische Grundstrukturen, aus denen Medizinische Chemiker die Therapeutika der Neuzeit schufen. Beispielsweise kamen antibakteriell wirkende, sulfonamidische Grundstrukturen aus der Farbforschung. Domagks Prontosil® war das erste Handelspräparat aus der Gruppe der Sulfonamide (ein Azofarbstoff) und revolutionierte die Therapie von Infektionskrankheiten (1935 in die Therapie eingeführt). Bei der verbreiteten Anwendung von Sulfonamiden als Chemotherapeutika fielen mit der Zeit zahlreiche, zunächst unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf. Mit Diamox® (Acetazolamid) wurde daraufhin 1950 das erste Sulfonamiddiuretikum in die Therapie eingeführt. 1956 folgten mit

¹ β_1 -selektiver Beta-Blocker

² β_1 -selektiver Beta-Blocker mit partieller agonistischer Wirkung

³ β_2 -selektives Sympathomimetikum

Invenol® und Nadisan® (Carbutamid) die ersten oralen Antidiabetika des Sulfonamidtyps (Auterhoff *et al.*, 1994).

Die moderne Wirkstoffforschung ist derzeit geprägt vom Hantieren mit großen Zahlen. Anfangs rein zufällig, mittlerweile aber zunehmend gezielt nach rationalen Vorstellungen erzeugen Kombinatorische Chemiker Substanzbibliotheken mit großer Diversität. In automatisierten Hochdurchsatz Analyseverfahren (*High-Throughput-Screening*, HTS) werden kombinatorisch generierte oder aus Naturstoffquellen stammende Substanzbibliotheken auf ihre biologische Aktivität gegenüber Zielproteinen hin untersucht. Hunderttausende von Verbindungen können so täglich getestet werden. Neben den klassischen *in vitro* Test werden heute immer mehr zellbasierte Assays im Hochdurchsatzverfahren durchgeführt. Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* soll dabei als wertvoller Organismus dienen. Molekulargenetisch wird *C. elegans* so modifiziert, dass er phenotypisch einen bestimmten Defekt aufweist (Link *et al.*, 2000). Im Hochdurchsatzverfahren soll dann die Wirkung von Substanzen auf den physiologischen Defekt von *C. elegans* hin getestet werden.

Viele Wirkstoffe, die das Potential zum Ausbau hin zu einem Arzneimittel in sich tragen, scheitern heute beim Schritt von *in vitro* zu *in vivo* Tests aufgrund unzureichender physikochemischer Eigenschaften. Aspekte der **A**bsorption des Wirkstoffes, dessen Verteilung (**D**istribution), **M**etabolisierung sowie **E**xkretion und **T**oxizität (ADMET) entscheiden darüber, ob ein Wirkstoff auf den Markt kommt oder zu einem Millionengrab wird. Hinter jedem Teilaspekt einer ADMET-Optimierung steht wieder die Frage nach Spezifität und Selektivität. Kommt es zu Wechselwirkungen des Pharmakons mit Transportmechanismen? Führt eine zu geringe Selektivität in Hinblick auf das Zielprotein zu toxischen Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren? Bedingt eine zu hohe Spezifität zu P450-Enzymen eine vorschnelle Metabolisierung und zu rapide Elimination des Wirkstoffs oder gar die Bildung toxischer Metabolite?

Ein großer Vorteil wäre daher, diese Fragen bereits *in silico* zu erörtern. Zu einem frühen Zeitpunkt also, bereits während des Designs von Liganden sollten Aspekte des ADMET sowie der Selektivität und Spezifität mit einfließen (siehe Abschnitt 1.3, Seite 9). Als Ergebnis würden der Medizin zum Wohle des Patienten neben wirksamen Pharmaka auch Substanzen mit größerer therapeutischer Breite und Sicherheit zur Verfügung stehen.

1.3 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Quantitative-Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR) dienen seit langer Zeit dem Wirkstoffchemiker, die Zusammenhänge zwischen chemischen Strukturen und biologischer Wirkung zu erfassen und quantitativ zu beschreiben, ohne dass dabei die Struktur des Rezeptors zwangsläufig bekannt sein muss. Substanzen einer chemisch einheitlichen Serie, die am gleichen biologischen System angreifen und dort einen identischen Wirkmechanismus aufweisen, werden über eine Korrelation ihrer physikochemischen Eigenschaften charakterisiert (Böhm *et al.*, 1996). Grundlage für solche mathematischen Verfahren ist die Annahme, dass Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften der diversen Substanzen für die relative Stärke ihrer Wechselwirkungen mit dem Rezeptor verantwortlich sind.

Ende der 80iger Jahre des vergangenen Jahrhunderts gelang es der amerikanischen Firma Merck, die Röntgenkristallstruktur der bei der Replikation des HI-Virus eine entscheidende Rolle spielenden HIV-Protease zu lösen (Navia *et al.*, 1989). Ausgehend von dieser und späteren Röntgenkristallstrukturen der HIV-Protease, zum Teil auch im Komplex mit Liganden, erfolgte ein überaus erfolgreiches Design von Enzyminhibitoren für die HIV-Therapie und trug deutlich zur Weiterentwicklung rationaler Ansätze der damals aktuellen Wirkstoffforschung bei. Entwickelte Inhibitoren wie Saquinavir⁴, Indinavir⁵ und Ritonavir⁶ verhindern die HIV-Protease assoziierte Abspaltung von langkettigen Polyproteinen nach der Transkription des Virusgenoms in kleinere, funktionelle Einheiten (Fitzgerald & Springer, 1991). Da dieser Vorgang während oder kurz nach der Freisetzungsphase des Virus von der Wirtszellmembran erfolgt und für die Infektiosität der HIV-Partikel essentiell ist, unterdrücken Protease-Inhibitoren den viralen Reifungsprozess auch in bereits infizierten Zellen (Zündorf & Dingermann, 2001).

Ein weiteres aktuelles Beispiel ist die rationale Entwicklung der Neuraminidase-Inhibitoren Zanamivir und Oseltamivir der Firmen GlaxoSmithKline und Hoffmann-La Roche. Zanamivir wurde 1998 als Virustatikum mit neuem Wirkungsmechanismus zur Therapie der Influenza A und B in Deutschland zugelassen (Waghorn & Goa, 1998). Die Neuraminidase spielt eine Schlüsselrolle bei der Ausbreitung des Virus in der Lunge. Mit dem Oberflächenprotein Hämagglutinin ist das Influenza-Virus in der Lage, die Zellen

⁴ Hoffmann-La Roche, 1991

⁵ Merck & Co., 1993

⁶ Abbott, 1994

des Respirationstraktes zu erkennen und über die Neuraminsäure an Zellen des Wirts zu binden. Das Virus wird in die Wirtszelle eingeschleust und veranlasst diese, neue Viren zu bilden. Die neuen Viren befinden sich anschließend über die Neuraminsäure gebunden auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die Neuraminidase katalysiert die Spaltung des Konjugates aus Virus, Neuraminsäure und Wirtszelle. Durch die Hemmung dieses entscheidenden Schrittes im Replikationszyklus des Virus können keine weiteren Zellen des Wirts infiziert werden (von Itzstein *et al.*, 1993).

Ansätze, wie das rationale Wirkstoffdesign, die direkt auf 3D-Ligand-Rezeptor-Strukturen basieren, erlauben einen detaillierteren Blick auf das atomare Verständnis der Wechselwirkungen. Mit Hilfe sogenannter 3D-QSAR Verfahren lassen sich aus der räumlichen Struktur des Liganden Eigenschaften wie z.B. die Bindungsaffinitäten zum Rezeptor ableiten. Böhm *et al.* haben in einem vergleichenden Ansatz die erfolgreiche Korrelation von Inhibitor-Serien gegenüber der Selektivität der drei verwandten Serinproteasen Trypsin, Thrombin und Faktor Xa demonstriert (Böhm *et al.*, 1999). Besonders aus den mit CoMSIA-Analysen erhaltenen Konturdiagrammen konnten Rückschlüsse auf die selektivitätsbestimmenden Molekülteile der Liganden gezogen werden.

Solche *rationalen* Bestrebungen laufen konträr zu Ansätzen der Versuchs-und-Irrtums-Strategie (*irrationaler* Methode), die allzu häufig als „Konzept“ bei der Entwicklung der meisten unserer Pharmaka gedient hat. (Dry *et al.*, 2000) zeigt den zyklischen Verlauf eines rationalen Wirkstoffdesign-Ansatzes.

Entscheidend für das Durchlaufen rationaler Entwicklungszyklen sind die Ermittlung struktureller Informationen über Protein-Ligand-Wechselwirkungen, die einen Einblick auf molekularer Ebene erlauben. Ein Haupthindernis für rationale Designansätze ist häufig der Mangel an strukturellen Information über die Zielproteine. Derzeit gibt es ca. 2803 Strukturen sequenzunabhängiger Proteine, davon sind etwa 726 humanen Ursprungs⁷. Eine geringe Zahl, wenn alleine für das menschliche Genom ca. 30.000 Genprodukte angenommen werden (Koonin *et al.*, 2002). Glaubt man den Strukturbiologen, so wird Dank leistungsfähiger Computer, Roboter und anderer *Hightech*-Errungenschaften auf dem Gebiet der Röntgenkristallographie und der NMR-Spektroskopie (Heinemann *et al.*, 2000) diese Zahl massiv ansteigen. In der Zeit, die man

⁷ FSSP-Datenbank (Version Juli 2002)
<http://www.ebi.ac.uk/dali/fssp/>

bisher zum Lösen einer Struktur gebraucht hat, werden zukünftig hunderte neuer Strukturen gelöst. Als ein weiteres Superlativ möchten Strukturbiologen die *Structural Genomics* im gleichen Maßstab wie zuvor die Genomsequenzierung vorantreiben (Dry *et al.*, 2000).

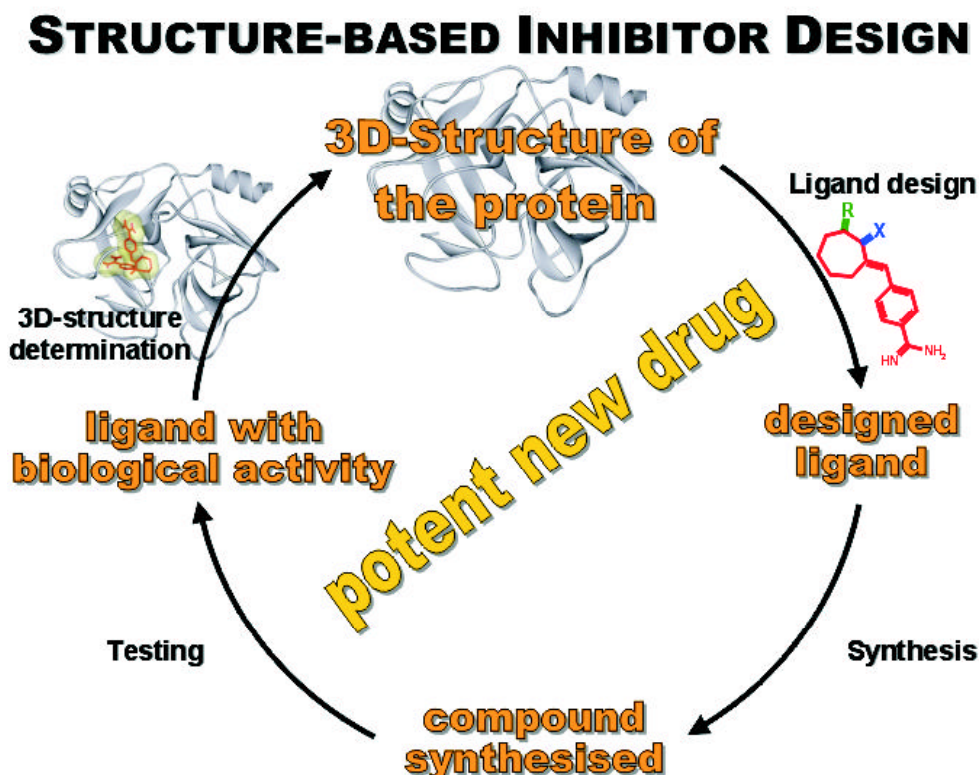


Abb. 1.3-1 Zyklus des rationalen Wirkstoffdesigns. Ausgehend von der 3D-Struktur des Zielproteins erlauben computergestützte Verfahren die Entwicklung erster Leitstrukturen. Erkenntnisse aus biologischen Tests sowie aus Bindungsstudien im Komplex mit dem Zielprotein fließen in einen erneuten Zyklus ein. Das sukzessive Optimieren der Leitstruktur im engen Dialog mit biologischen Test sowie Strukturdaten kann zu neuen potenten Wirkstoffen führen.

Sicherlich bleibt abzuwarten, welchen Nutzen die *Structural Genomics* tatsächlich für die Entwicklung neuer Pharmaka haben werden. Die beeindruckenden Beispiele, in denen die Kristallstruktur von Zielproteinen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe geführt hat, beschränken sich bisher auf Enzyme wie die HIV-Protease (Virustatika), Thrombin (Antikoagulantia), Cyclooxygenase (Antirheumatika) oder die Carboanhydrase (Glaukombehandlung). Jedoch richten sich die meisten Wirkstoffe gegen Membranproteine wie die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (ChemBioChem, 2002).

Im Jahre 1996 standen ca. 500 molekulare Zielproteine im Mittelpunkt von Medizin und Therapie. Davon waren ca. 45% membranständige Rezeptoren wie die G-Proteingekoppelten Rezeptoren und nur ca. 28% Enzyme (Drews & Ryser, 1997). Trotz großer Anstrengungen, Membranproteine zu kristallisieren, führten diese bisher nur zu einem strukturell charakterisierten GPCR, dem bovinen Rhodopsin (Palczewski *et al.*, 2000). So besteht die Gefahr, dass die Hochdurchsatztechniken der *Structural Genomics* das Augenmerk auf einfach zu kristallisierende Proteine richten werden und so nur Wirkstoffe gegen weniger relevante Zielstrukturen entwickelt werden.

Nicht jedes Zielprotein steht somit in seiner 3D-Struktur den modernen Methoden der Wirkstoffforschung zur Verfügung. Genügend reines Protein muss in ausreichender Menge vorliegen und zu ausreichend gut beugenden Kristallen heranwachsen. Obwohl immer mehr Röntgenkristallstrukturen (derzeit ca. 20.000) aufgeklärt werden, ist das Kristallisieren von Proteinen immer noch und gerade bei den Hochdurchsatzmethoden eine enorme Herausforderung. Mit neuen Ergebnissen aus dem Bereich der *Genomics* und *Functional Genomics* ist zu erwarten, dass die beschriebene Problematik der mangelnden Proteinstrukturen an Bedeutung zunehmen wird.

Hier wäre es von entscheidendem Nutzen bereits auf Computerebene, das Problem des Mangels an Proteinstrukturen zu umgehen. Bestrebungen der Homologie-Modellierung, ausgehend von der Struktur eines verwandten Proteins auf die unbekannte Struktur eines Zielproteins zu schließen und die generierte strukturelle Information für das Wirkstoffdesign zu nutzen, werden mit Hochdruck verfolgt (Klabunde & Hessler, 2002). Jedoch reicht die Vorhersagekraft, besonders der geometrischen Gegebenheiten in den Bindetaschen der Zielproteine, aufgrund mangelnder Akkuratheit nicht für die heute verwendeten Docking-Verfahren und das Liganden-Design aus (Schafferhans & Klebe, 2001).

Heute betrachten wir die Fragen in Hinblick auf maximale Diversität, wie sie von einem Chemiker gestellt oder mit Hilfe von Deskriptoren quantifiziert werden, aus einer anderen Perspektive. Beispiele von Dixon und Villar (Dixon & Villar, 1998) haben gezeigt, dass eine Gruppe niedermolekularer Liganden, bezüglich ihrer Struktur, sehr divers mit ähnlichen Affinitäten (nanomolarer Bereich) an ein Protein binden kann. Dagegen konnten auch Strukturen, die der affinsten, nanomolaren Verbindung im Rahmen dieser Deskriptoren sehr ähnlich waren, deutlich geringere, Affinitäten (im millimolaren Bereich) ermittelt werden. Offensichtlich sieht ein Rezeptor ein Substrat oder Ligand mit „anderen Augen“ als wir es mit diesen aufgestellten Deskriptoren vermögen.

Ausgehend von Bindungsgeometrien in Raumstrukturen der Protein-Ligand-Komplexe kann man nicht immer direkt auf deren Affinität schließen. In der Tat gibt es eine Reihe von Wechselwirkungen, die bei der Bindung eines Liganden eine entscheidende Rolle spielen und nicht direkt aus den Bindungsgeometrien von Protein-Ligand-Komplexen ableitbar sind (siehe Abschnitt 1.3.1, Seite 9). Ordnungsphänomene wie Änderungen in der Wasserstruktur, die sich stark vom gebundenen oder ungebundenen Zustand unterscheiden, oder Flexibilitäten und Schwingungszustände ändern sich ebenfalls beim Binden und spiegeln sich im Gesamtbetrag der Entropie und damit der Bindungsenergie wider.

Aber auch bei der Frage, eine verbesserte Bioverfügbarkeit zu erreichen, ist eine differenzierte Betrachtung angebracht. Oftmals ist es erforderlich, die Anzahl von Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren sowie von Ladungen zu reduzieren (Clark & Pickett, 2000). Um Selektivität eines Liganden gegenüber einem Zielprotein zu erhöhen, versucht der Medizinische Chemiker, das Design von Liganden auf Subtaschen des Proteins auszudehnen. Navia konnte zeigen, dass Wirkstoffe mit einem Molekulargewicht von über 550 Da statistisch gesehen eine geringere Bioverfügbarkeit aufweisen als Verbindungen mit einem Molekulargewicht kleiner 550 Da (Navia & Chaturvedi, 1996). Die Herausforderung besteht in der Adressierung benachbarter Bindetaschen mit dem Liganden und dabei die Größe des Liganden möglichst klein zuhalten. Später wurden diese Erkenntnisse von Lipinski um die „*Rule of five*“ erweitert (Lipinski *et al.*, 1997): Das Molekül soll nicht mehr als fünf Wasserstoffbrückendonoren aufweisen, ein Molekulargewicht größer 500 Dalton und einen log *P*-Wert größer als 5 besitzen, sowie über mehr als zehn Bindungsakzeptoren verfügen. Diese stellen heute allgemeingültige Regeln für das Design ADMET-konformer Pharmaka dar. Die beschriebenen Einschränkungen hinsichtlich der theoretischen Designwünsche und der praktischen Bioverfügbarkeit limitieren oftmals die Entwicklung von Verbindungen hinreichender Spezifität und damit reduzierter unerwünschter Arzneimittelwirkungen.

1.3.1 Affinität, das Resultat aus dem Zusammenspiel von Entropie und Enthalpie

Im physikochemischen Verständnis begreifen wir die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor als die Summe chemischer und geometrischer Parameter, die zu einem biologischen Effekt als Resultierende führt. Affinität ist demnach der Betrag aus

elektrostatischen Wechselwirkungen, Solvation und Desolvation sowie der sterischen Anpassung von Protein und Ligand bei deren Assoziation.

Lässt sich heute die Bindung eines Liganden an ein Protein messen, so erhält man als charakteristische Größe die Bindungskonstante. Sie gilt als ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand. Als thermodynamische Gleichgewichtskonstante gibt sie an, welcher Anteil des Liganden an das Protein gebunden ist. In einfachen (*geschlossenen*) Systemen legt man das Massenwirkungsgesetz zugrunde. Betrachtet man hingegen die direkte Wechselwirkung eines Liganden mit seinem Rezeptor (*offenes* System), so gelten diese einfachen Zusammenhänge nicht mehr. Zusätzliche Effekte wie Fließgleichgewichte und Konzentrationsgradienten müssen in die Betrachtung miteinbezogen werden.

Unter Standardbedingungen im Gleichgewicht lassen sich Bindungskonstanten als Freie Enthalpie ΔG ausdrücken, die sich wiederum aus einem enthalpischen (ΔH) und einem entropischen ($-T\Delta S$) Term zusammensetzt. K_A ist die thermodynamische Gleichgewichtskonstante zur Bildung des Ligand-Protein-Komplexes und verhält sich reziprok zur Dissoziationskonstante K_D .

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_A = RT \ln K_D = \Delta H - T\Delta S$$

K_D wiederum steht in reziprokem Zusammenhang mit der Inhibitionskonstante K_i , die z.B. aus kinetischen Experimenten über die kompetitive Hemmung eines Substrats registriert werden kann.

Experimente zeigen, dass die Bindungsenthalpie ΔH nicht mit der freien Bindungsenthalpie ΔG korreliert. Zum besseren Verständnis des Bindungsprozesses kann daher eine Aufteilung der freien Bindungsenthalpie in physikalisch sinnvolle und interpretierbare Einzelbeiträge versucht werden (Connelly, 1994). Fragen bezüglich des Protonierungszustandes eines Liganden, die Abschätzung von Solvationsbeiträgen und damit verbunden der Lipophilie sowie Veränderungen in der Wasserstruktur führen zu einem multidimensionalen Problem, für das es derzeit keine hinreichenden Beschreibungen gibt. Computerprogramme können diese Fragestellungen nicht mit der erfordernten Exaktheit beschreiben; nur das Experiment kann an dieser Stelle die benötigten Daten liefern.

Häufig beschriebene Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen, Metallkomplexierungen, hydrophobe Kontakte oder Wechselwirkungen eines Kations mit den π -Elektronen eines ungesättigten Systems (Böhm & Klebe, 1996). Hochaufgelöste 3D-Strukturen von Protein-Ligand-Komplexen bieten eine Möglichkeit, die genannten Wechselwirkungen direkt aufgrund von Distanzen und Geometrien abzuleiten und in das Verständnis von Affinität bzw. deren Faktoren mit einfließen zu lassen. Eine Reihe anderer Größen, die im Vorfeld der Bindung ablaufen und mit zur resultierenden Affinität beitragen und nicht direkt aus Strukturdaten abgeleitet werden können, sind u.a. Effekte wie die Solvation bzw. Desolvation, das Einfrieren von Bewegungsfreiheitsgraden und die Verdrängung von Wassermolekülen. Kommt es durch die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor zu einer Änderung im Ordnungsgrad bzw. zu einer Umverteilung von Energiebeiträgen über molekulare Freiheitsgrade, wie z.B. Konformationen, so drückt sich dies in entropischen Beiträgen aus. Entropische Effekte stehen somit nicht unmittelbar mit direkten Wechselwirkungen im Zusammenhang, sondern beschreiben die Änderung der Freiheits- und Ordnungsgrade im komplexen Zusammenspiel von Protein-Ligand-Wechselwirkungen unter Berücksichtigung allseits präsenten Wassers. Die thermodynamische Beschreibung ist stets eine globale Charakterisierung des Systems.

Die Bindungsaffinität ist demnach die Resultierende aus enthalpischen und entropischen Beiträgen, die bei der Assoziation von Ligand und Protein auftreten. Somit müssen zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten die enthalpischen und entropischen Komponenten als treibende Kraft der Bindungsprozesse bekannt sein. Informationen bezüglich des Verhältnisses beider Beiträge für einen gegebenen Protein-Ligand-Komplex können zur entscheidenden Größe bei der Optimierung von Affinität werden.

Mittels mikrokalorimetrischer Messungen lassen sich entropische und enthalpische Bindungsbeiträge experimentell erfassen und bestimmen (Ladbury & Chowdhry, 1996). Nur wenige Rezeptor-Ligand-Komplexe wurden sowohl strukturell als auch physikochemisch charakterisiert (Davies *et al.*, 1999; Dullweber *et al.*, 2001; Ohtaka *et al.*, 2002; Sleight *et al.*, 1999), da oftmals die einzusetzende Proteinmenge der limitierende Faktor für vertiefende thermodynamische Untersuchungen ist. Ein Beispiel für die Komplexität von Protein-Ligand-Wechselwirkungen beschreibt neben der strukturellen auch die thermodynamische Charakterisierung von Trypsin- und Thrombin-Inhibitor-Komplexen mittels *isothermer Titrationskalorimetrie* (ITC) (Dullweber, 2000). In einer gleich gearteten Gruppe von Inhibitoren, die überraschenderweise große Differenzen in den

Affinitäten zu beiden Proteinen zeigten, wurde ein signifikanter Unterschied in den Protonierungszuständen der Liganden gefunden. Die beobachteten pK_a -Verschiebungen während der Assoziation von Ligand und Protein sind dabei dem Bindungsprozess überlagert. Des weiteren wurde für alle untersuchten Liganden eine stark negative Wärmekapazitätsänderung beobachtet. Die Bindung des Liganden wird somit bei steigender Temperatur zunehmend exothermer und entropisch unvorteilhafter, obwohl die Inhibitionswerte (K_i) gleich bleiben (Dullweber *et al.*, 2001). Dieser Verlauf ist als Enthalpie-Entropie-Kompensation beschrieben (Dunitz, 1995).

Auch der Einfluss des Proteins auf den Liganden kann von entscheidender Bedeutung sein. Kommt es durch Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu einer Verschiebung in der Elektrostatik, kann z.B. aus einer ungeladenen Wasserstoffbrücke eine Salzbrücke mit wesentlich erhöhten Enthalpiebeitrag resultieren. Denkbar ist auch, dass eine Akzeptorgruppe zu einem Donor wird, was zur Folge hat, dass der Ligand mit verringerter Affinität bindet und somit das rationale Konzept auf den Kopf gestellt ist, da es von falschen experimentellen Gegebenheiten ausgegangen ist.

Wie wichtig das Verständnis des Zusammenspiels selektivitätsbestimmenden Faktoren selbst für etablierte Zielstrukturen ist, verdeutlicht das Beispiel der HIV-Protease. Als limitierend bei der Therapie HIV-infizierter Patienten hat sich die stetig zunehmende Resistenzentwicklung erwiesen (Roberts, 1995). Schätzungen gehen davon aus, dass bereits jede siebte HIV-Neuinfektion in den USA durch Virusstämme verursacht wird, die mindestens gegenüber eines Inhibitors (aus der Klasse der HIV-Protease-Inhibitoren) resistent sind. Untersuchungen mit Hilfe der isothermalen-Titrationskalorimetrie haben gezeigt, dass HIV-Protease-Inhibitoren der ersten Generation (Amprenavir, Nelfinavir, etc.) eher entropiegetrieben und Inhibitoren der zweiten Generation (TMC-126) eher enthalpiegerieben binden. Durch Mutationen in der HIV-Protease verlieren Inhibitoren beider Generationen an Bindungsenthalpie. Die Experimente zeigen aber auch, dass Inhibitoren der zweiten Generation den Verlust an Enthalpie durch eine Zunahme an Entropie ausgleichen können. In diesem Fall erlaubt eine genügende konformative Flexibilität des Liganden, Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren der Bindetasche einzugehen, woraus ein leicht veränderter Bindungsmodus und dadurch Veränderungen in der Solvation von Ligand und Bindetasche resultieren (Ohtaka *et al.*, 2002).

Der Chemiker kann im Rahmen des Wirkstoffdesign durch Modifikation von funktionellen Gruppen, z.B. durch die Ausbildung einer neuen Wasserstoffbrücke, den Anteil der Enthalpie an der Bindung erhöhen. Eine Bestrebung im rationalen Design geht

dahin, Liganden möglichst in ihren konformativen Freiheitsgraden einzuschränken und somit rigider zu gestalten, was ebenso einen günstigen Einfluss auf den entropischen Beitrag hat, neben dem Anteil, der dem Verdrängen von Wassermolekülen aus der Bindetasche des Proteins durch Binden des Liganden entspricht. Denkbar wäre auch, dieses Wassermolekül durch eine Umgestaltung (Design) des Liganden mit in den Bindungsprozess einzubeziehen und somit einen Beitrag zur Enthalpie zu leisten. Letztendlich bestimmt die treibende Kraft des Bindungsprozesses darüber, für welche Strategie man sich entscheiden muss.

Werden heute wissenschaftliche Ansätze für die Vorhersage und Bewertung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen angewendet, so zeigt sich immer mehr die Genauigkeit der Strukturdaten als limitierender Faktor solcher Ansätze. Als Wissensbasis dienen oft strukturelle Informationen aus Protein-Ligand-Komplexen. Die Strukturen geben dabei nur das finale Bild der Protein-Ligand Assoziation wieder. Für die Innovation im computergestützten, rationalen Wirkstoffdesign ist es essentiell, Klarheit über die Größe und Bedeutung der physikochemischen Parameter zu erhalten. Letztendlich bestimmen diese Größen über die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor und somit über die biologischen Wirkungen.

Aber auch der abgelesene Bindungsmodus eines Liganden aus einer experimentell bestimmten Elektronendichte, muss manchmal mit anderen Augen gesehen werden. Stubbs *et al.* berichtete jüngst über einen pH-abhängigen Bindungsmodus eines potenten Faktor Xa Inhibitors der Firma Zeneca (**Tabelle 1-4**, Seite 24) in Trypsin. Bei pH 8 bindet der Inhibitor mit seiner Chloronaphthylgruppe in der primären Spezifitätstasche von Trypsin während bei pH 7 die Pyridingruppe diese Position einnimmt (Stubbs *et al.*, 2002). Von welcher Konformation in der Bindetasche soll der Medizinische Chemiker ausgehen? Gibt es überhaupt *den* Bindungsmodus eines Liganden? Wie stark kann dieser mit der Kristallstruktur bzw. mit den bei der Kristallzüchtung verwendeten Bedingungen variieren?

Die wenigen bisher in der Literatur beschriebenen Beispiele zeigen, dass wir erst am Anfang des Verständnis der Wechselwirkungen auf atomarer Ebene stehen. Die Gefahr des Verkennens bzw. das Unterschätzen der Bedeutung dieser affinitätsbestimmenden Faktoren für das Wirkstoffdesign ist groß. Für das Einführen eines Liganden in die Bindetaschen eines Rezeptors mittels Computermethoden (*Docking*) und die relative Bewertung der vorgeschlagenen multiplen Bindungsmoden (*Scoring*) ist das Unterschätzen dieser Parameter fatal und muss zwangsläufig zu falschen Ergebnissen führen.

1.4 Das Modellsystem

1.4.1 Faktor Xa als Zielprotein für das Wirkstoffdesign

In der Therapie zur Verhinderung *intravasaler* Ereignisse, wie z.B. Thrombenbildung, unterscheidet man zwischen Antikoagulantien und Substanzen, die der Thrombozytenaggregation entgegen wirken. Während Antikoagulantien die Wirkung oder Entstehung von Thrombin und damit die Bildung von Fibrin vermindern, unterdrücken Thrombozytenaggregationshemmer die Aktivierung und Aggregation von Blutplättchen. Eine geringe therapeutische Breite und das Auftreten von Blutungen bei den etablierten Therapeutika wie Heparin, Acetylsalicylsäure und den Cumarinen haben zu einer ungünstigen Bewertung der Nutzen-Risiko-Relation geführt und neue Impulse in der Entwicklung von Antithrombotika gesetzt (Hirsh, 1991a; Hirsh, 1991b; Hirsh & Weitz, 1999; Patrono, 1994).

Klinisch besteht ein großer Bedarf an neuen parenteralen Antithrombotika, die effektiv und sicher in der Kombination mit Fibrinolytika oder GPIIb/IIIa Antagonisten bei Patienten mit akutem Koronar-Syndrom wirken. Oral verfügbare Thrombin- und Faktor Xa-Inhibitoren sollen die Cumarine ablösen und dem Patienten eine größere Sicherheit vor Blutungen geben sowie aufwendige und teure Laboruntersuchungen ersparen. Im Gegensatz zu früheren Entwicklungen von Antithrombotika, deren Wirkung eher zufällig entdeckt wurde, sind neuere Wirkstoff mit Hilfe von Methoden des rationalen Wirkstoffdesigns entwickelt worden.

Das besondere Interesse in Faktor Xa resultiert aus seiner zentralen Rolle im Schnittpunkt zwischen dem *intrinsischen*⁸ und *extrinsischen*⁹ Weg der Blutgerinnung. Die Aktivierung des Faktor Xa-Zymogens nach einer Gewebeläsion erfolgt im *extrinsischen* Weg durch einen Komplex aus Faktor VIIa und Gewebefaktor (*Tissue Factor*), während der Komplex aus Faktor IXa und Faktor VIIIa *intrinsisch* Faktor Xa aktiviert. Als katalytisch aktiver Bestandteil des Prothrombinase-Komplexes (siehe Abschnitt 1.4.2) ist Faktor Xa maßgeblich an der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin beteiligt. Thrombin wandelt Fibrinogen in Fibrin um, welches das Blut gerinnen lässt, und ist ferner an der Aktivierung weiterer Gerinnungsfaktoren beteiligt.

⁸ Endogener Weg nach Verletzung des Endothel oder Zerfall von Thrombozyten (Ablauf in Minuten)

⁹ Exogener Weg durch Kontakt mit Tissue Factor (Ablauf in Sekunden)

Obwohl derzeit keine überzeugenden klinischen Beweise für eine größere therapeutische Breite als bei Heparinen oder Cumarinen existieren (Hirsh & Weitz, 1999), ist das Interesse der pharmazeutischen Industrie an der Entwicklung neuer Inhibitoren für diese Zielproteinen groß.

1.4.2 Struktur und Aktivität von Faktor Xa

Faktor X besteht als inaktives Zymogen aus zwei Ketten, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die sogenannte leichte Kette des Faktor X wird aus 139 Aminosäuren gebildet und besteht aus einer Gla (*g*-Carboxyglutamat)-Domäne, an die zwei EGF-Domänen (*Epidermal growth factor*) angehängt sind. Die schwere Kette des Faktor X ist aus 303 Aminosäuren zusammengesetzt und enthält eine aus 52 Aminosäuren bestehende Aktivierungssequenz, die von einer Protease-Domäne (trypsinähnlich und für die Katalyse verantwortlich) gefolgt wird. Die Aktivierung zu Faktor Xa erfolgt durch Proteolyse der Aktivierungssequenz auf der Oberfläche von Phospholipidmembranen in Anwesenheit von Calciumionen (Davie *et al.*, 1991). Der entstandene Faktor Xa bindet mit seiner Gla-Domäne in Anwesenheit von Calciumionen auf negativgeladenen Phospholipidmembranen und leitet zusammen mit Faktor Va und Calciumionen als Prothrombinase-Komplex die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin ein. Der gebildete Prothrombinase-Komplex hat eine um den Faktor 1.000.000 erhöhte Aktivität gegenüber Prothrombin (Rosing *et al.*, 1980).

Der Aufbau aus mehreren Domänen unterscheidet Faktor Xa stark von Trypsin – allerdings weist die katalytische Domäne des Faktor Xa eine zu Trypsin und Chymotrypsin sehr ähnliche Faltung auf.

1.4.3 Trypsin als Modell für Faktor Xa

Über viele Jahre hinweg entzog sich Faktor Xa aufgrund unzureichender Kristallisationseigenschaften den Methoden eines rationalen strukturbasierten Ansatzes (Adler *et al.*, 2000; Brandstetter *et al.*, 1996; Kamata *et al.*, 1998; Maignan *et al.*, 2000; Nar *et al.*, 2001; Padmanabhan *et al.*, 1993). Um dieses Problem zu umgehen, wurde erfolgreich die Serinprotease Trypsin zur strukturellen Analyse der Bindungsmodi von Faktor Xa Inhibitoren verwendet (Pinto *et al.*, 2001; Renatus *et al.*, 1998; Sperl *et al.*, 2000a; Stubbs *et*

al., 1995; Stubbs *et al.*, 2002; Whitlow *et al.*, 1999). Zahlreiche Komplexstrukturen lieferten dabei wichtige Hinweise über mögliche Bindungsmodi und affinitätsbestimmende Pharmakophore.

1.4.4 Proteinstruktur und Spezifität von Trypsin

Trypsin gehört wie Faktor Xa zur Klasse der chymotrypsinähnlichen Proteasen. Der strukturelle Aufbau der Vertreter dieser Klasse ist nahezu identisch. Die Proteasedomänen trypsinähnlicher Serinproteasen bestehen aus zwei Domänen, die jeweils über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. In Trypsin sind die Aminosäuren in zwei sechssträngigen β -Barrels organisiert.

In **Abb. 1.4-1** sind die lösungsmittelzugänglichen Oberflächen von Trypsin und Faktor Xa dargestellt und die Unterschiede in den Substratbindetaschen beider Enzyme farblich hervorgehoben.

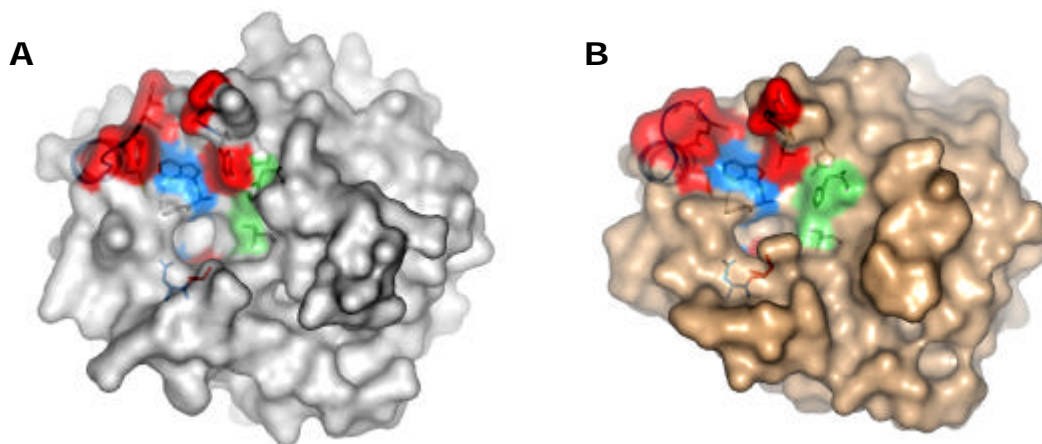


Abb. 1.4-1 Lösungsmittelzugängliche Oberfläche von Faktor Xa [**A**] und Trypsin [**B**]. Rot hinterlegt die Bereiche der Bindetasche, die von Faktor Xa auf Trypsin mittels Mutagenese übertragen wurden. Die katalytische Triade ist grün dargestellt. Als wichtige Wechselwirkungspartner für Substrat und Ligand sind zur Orientierung in den Bindetaschen Trp215 und Asp189 blau eingefärbt.

Die Nummerierung der Aminosäuren orientiert sich an Chymotrypsin, dem ersten strukturell aufgeklärten Vertreter dieser Klasse. Neben der Proteasedomäne enthalten viele Vertreter von Serinproteasen noch zusätzliche Domänen (z.B. *Kringle*, *epidermal growth factor* ähnliche Domänen (EGF), etc.).

Die Aktivierung der katalytisch inaktiven Proteasen erfolgt durch Abspaltung der N-terminalen Aktivierungsdomäne. Der dabei neu entstandene N-Terminus mit Ile16 bildet eine im Inneren des Enzyms vergrabene Salzbrücke zu Asp194 und induziert eine Konformationsänderung, welche die Ausbildung der primären Spezifitätstasche und des *Oxyanion Hole* zur Folge hat (Bode, 1979; Bode *et al.*, 1989). Die Inaktivierung der Proteaseaktivität bei pH-Werten größer 10 liegt in der Deprotonierung des N-Terminus und dem damit verbundenen Auflösen der Salzbrücke zwischen Ile16 und Asp194 begründet (Fersht, 1972).

Die katalytische Triade und die Substratbindetasche befinden sich zwischen den beiden Domänen und werden durch Aminosäurereste beider Hälften gebildet (Lesk & Fordham, 1996). Trypsinartige Serinproteasen lassen sich weiter anhand ihrer primären Substratspezifitäten klassifizieren. Spaltstellen im Substrat sowie Substratbindestellen des Enzyms sind nach der Nomenklatur von Schechter und Berger benannt, wonach der Rest N-terminal auf der zu spaltenden Bindung als P1, der vorhergehende als P2 usw. bezeichnet wird (Schechter & Berger, 1967). Analog dazu werden Reste C-terminal zu der zu spaltenden Bindung mit P1', P2', P3' ... bezeichnet. Bindetaschen des Enzyms, die Seitenketten des zu spaltenden Substrats aufnehmen, werden mit S1, S2, S3 ..., bzw. S1', S2', S3' ... bezeichnet. Trypsin spaltet Substrate nach einem basischen Rest wie Arginin oder Lysin. Chymotrypsin hingegen bevorzugt in P1 hydrophobe oder aromatische Reste (Ong & Schollmann, 1966). Determinierend für die beschriebene, primäre Spezifität ist die Struktur der Spezifitätstasche S1. In trypsinähnlichen Serinproteasen befindet sich am Boden der S1-Tasche die Seitenkette eines Aspartats (Asp189). Diese Seitenkette kann Salzbrücken zu basischen Aminosäureseitenketten ausbilden und die Bindung des Substrates maßgeblich stabilisieren. Die Spezifität von Chymotrypsin korreliert mit hydrophoben Resten in P1. Die Kombination aus Ser189, Gly216 und Gly226 bildet eine tiefe hydrophobe Tasche und bestimmt die Spezifität von Chymotrypsin (Marshall & Akgun, 1971). Aufgrund der Aminosäuren Val216 und Thr226 ist die S1-Tasche der Elastase kleiner als die S1-Tasche von Trypsin und Chymotrypsin. Elastase bevorzugt daher kleine aliphatische Reste in P1 (Shotton & Hartley, 1970).

Als weitere wichtige Determinante der primären Spezifität dient die Aminosäure in Position 190. Serinproteasen wie Trypsin und Urokinase tragen an dieser Position ein Serin, während Thrombin und Faktor Xa dort ein Alanin aufweisen. Der γ -Sauerstoff der Ser190-Seitenkette stabilisiert die Bindung von Lysin-Seitenketten durch ein vermittelndes Wassermolekül. Der Austausch des Serins gegen ein Alanin (Faktor Xa, Thrombin)

verschiebt die Spezifität von Lysin in Richtung Arginin in Position P1 des Substrates (Perona & Craik, 1995; Perona & Craik, 1997; Sichler *et al.*, 2002) (sowie noch nicht publizierte eigene Arbeiten; siehe Abschnitt 3.5.1).

Faktor Xa besitzt ferner eine ausgeprägte S2-S4-Substratspezifität, die über die 99-Schleife (Reste 94-99) definiert wird. Die Seitenkette von Tyr99 erschwert den Zugang zur S2-Tasche, wodurch sich der Vorzug gegenüber Glycin in P2 erklären lässt (Padmanabhan *et al.*, 1993) (siehe auch Abschnitt 3.5). In Faktor Xa bildet die Seitenkette von Tyr99 zusammen mit den Seitenketten von Trp215 und Phe174 eine hydrophobe-aromatische Tasche (S3-S4), die besonders von hydrophoben Resten in P4 (Isoleucin oder Alanin) adressiert wird (Bode *et al.*, 1997). Trypsin zeigt aufgrund unterschiedlicher Oberflächenschleifen in den Bereichen der 99- und 175-Schleifen eine sehr breite Substratspezifität für P2-P4.

1.4.5 Experimentelle Methoden zur Selektivitätsfrage

Je weiter wir mit unserem Verständnis in die physiologischen Abhängigkeiten von Krankheiten auf molekularer Ebene vorstoßen, desto komplexer werden die Wirkprofile potentieller Pharmaka bzw. desto weiter steigen Anforderungen an Selektivität und Spezifität (siehe Abschnitt 1.3).

Ursprünglich wurde die Spezifität von Proteasen anhand von Substraten mit einer Vielzahl von Spaltzellen wie Casein getestet. Später konnten besonders bei Proteasen mittels *Phage-Display* (Barrios & Craik, 2002; Harris *et al.*, 1998; Kridel *et al.*, 2001; Nixon, 2002) und kombinatorisch generierten fluorogenen Substratbibliotheken (Harris *et al.*, 2000) Profile zur Substratspezifität erstellt werden. Die erweiterte (bevorzugte) Substratspezifität für das Proteasom (Harris *et al.*, 2001) oder für pharmazeutisch relevante Zielproteine wie Thrombin und Plasmin (Backes *et al.*, 2000; Butenas *et al.*, 1997) konnte so aufgeklärt werden (siehe Abschnitt 3.5).

Das klassische Experiment, um Substratspezifitäten bei Serinproteasen zu ändern, ist der Austausch des zentralen Asp189 gegen ein Lys in Trypsin und die damit einhergehende Umkehrung der Substratspezifität von basischen zu sauren Gruppen in der P1-Substratposition (Graf *et al.*, 1987; Perona *et al.*, 1993). Einige Jahre später wurde in der Cysteinprotease Papain die S2-Subtasche durch zielgerichtete Mutagenese in eine Cathepsin-B-Spezifität umgewandelt (Khoury *et al.*, 1991). Durch eine Reihe von

Mutationen in der bakteriellen Serinprotease Subtilisin konnte gezeigt werden, dass die durch den Austausch des für die Katalyse entscheidenden Histidins gegen ein Alanin stark reduzierte enzymatische Aktivität durch ein P2-Histidin haltiges Substrat rekonstituiert werden kann (*Substrat-gestützte Katalyse*) (Carter & Wells, 1987). Durch den Austausch des katalytischen Serins gegen ein Cystein wurde die Protease Subtilisin in eine Ligase umgewandelt (Abrahmsen *et al.*, 1991). Rattentrypsin wurde mittels Mutagenese in ein chymotrypsinähnliches Enzym umgewandelt (Hedstrom *et al.*, 1992). Hopfner *et al.* wandelten mittels Mutagenese Faktor IXa in Richtung Faktor Xa um und fusionierten die N-terminale Subdomäne von Faktor X mit der C-terminale Subdomäne von Trypsin. Das Resultat war ein Enzym mit neuen kinetischen Eigenschaften (Hopfner *et al.*, 1997; Hopfner *et al.*, 1998).

Auch für die Entwicklung biologisch aktiver Liganden, wie z.B. Proteaseinhibitoren, ist das Verständnis von Substratspezifitäten wichtig. Manche Ansätze verfolgen ausgehend von der Struktur eines Substrats durch den sukzessiven Ersatz von Peptidbindungen oder den Einbau isosterer Gruppen, die Synthese von Peptidomimetika (West & Fairlie, 1995).

Methoden zum *Re-Design* von Rezeptor-Ligand-Schnittstellen finden heute in der Erforschung biologischer Systeme immer mehr Verwendung (Koh, 2002). Rezeptor und Ligand werden molekularbiologisch bzw. chemisch-synthetisch variiert und anschließend bezüglich ihrer Affinität charakterisiert. Bei der „*Bumps and Holes*“ - Methode wird z.B. der Ligand chemisch so modifiziert, dass er sterisch nicht mehr in die Bindetasche des Rezeptor passt. In einem zweiten Experiment wird die Bindetasche des Rezeptors durch Mutation so erweitert, dass der sterisch anspruchsvolle Ligand mit dem Rezeptor erneut wechselwirken und Bindungen eingehen kann (Belshaw *et al.*, 1995). Mit Hilfe solcher chemisch-genetisch kombinierter Ansätze ist es gelungen, Proteinkinasen trotz ihrer über die gesamte Proteinfamilie stark konservierten Bindetaschen selektiv zu inhibieren und Transduktionsmechanismen an intakten Organismen zu untersuchen (Bishop *et al.*, 1999; Bishop *et al.*, 1998; Bishop & Shokat, 1999).

1.4.6 Aufgabenstellung – Trypsinvarianten für das Verständnis von Selektivitätsdeterminanten in Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Um ein System zu erhalten, das ein detaillierteres Bild zur Erforschung der Determinanten von Protein-Ligand-Wechselwirkungen im Fall des Faktor Xa erlaubt,

haben Reyda *et al.* die Ligandenbindetasche des Faktor Xa in Rattentrypsin mittels Mutagenese eingeführt (Reyda *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den vorher genannten Arbeiten (Graf *et al.*, 1987; Hedstrom *et al.*, 1992; Hopfner *et al.*, 1997; Hopfner *et al.*, 1998; Khouri *et al.*, 1991) stand das Erschaffen einer Enzymchimäre für das strukturbasierte Wirkstoffdesign im Interesse. Es wurden zwei Rattentrypsinvarianten in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und kinetisch sowie kristallographisch charakterisiert (Reyda *et al.*, 2003). Zwar konnte die Durchführbarkeit dieser neuen Methode mit den kinetischen und kristallographischen Ergebnissen weitgehend bewiesen werden, jedoch ließen sich die notwendigen kristallographischen Charakterisierungen der zugehörigen Proteinkomplexe nicht in der gewünschten Breite durchführen (**Abb. 1.4-2**).

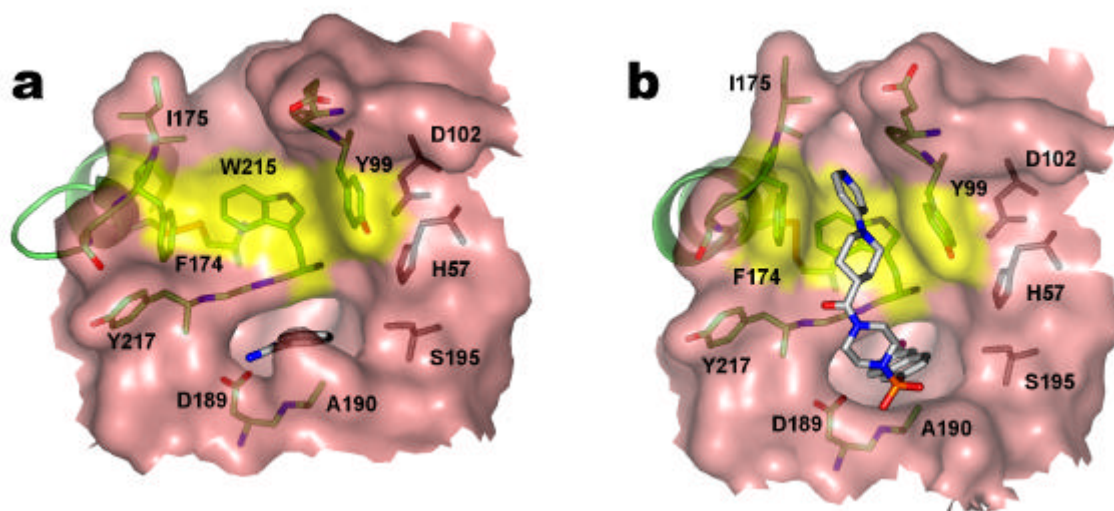


Abb. 1.4-2 Die Abbildung zeigt die lösungsmittel zugängliche Oberfläche der Rattentrypsinvariante mit den drei Schleifen der Faktor Xa Bindetasche (99-, 190- und 175-Schleife). (a) unerwartete Konformation (nicht Faktor Xa Konformation) im Komplex mit Benzamidin; (b) erwartete Konformation (Faktor Xa Konformation) im Komplex mit einem Faktor Xa spezifischen Inhibitor (Zeneca; **Tabelle 1-4**, Seite 24).

Experimente zum Eindiffundieren von Benzamidin-basierenden Inhibitoren resultierten in für die Röntgenstrukturanalyse ungeeignete Kristalle (Reyda *et al.*, 2003). Da die röntgenkristallographische Charakterisierung der Komplexe entscheidende Informationen geben sollte und zudem strukturelle Änderungen in den 99- und 175-Schleifen der Varianten weiteres Interesse weckten, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Ligandenbindetasche des Faktor Xa auf bovines Trypsin übertragen und die erhaltenen Proteinvarianten kinetisch und kristallographisch charakterisiert werden.

Bovines Trypsin bietet den Vorteil, dass in großer Breite bereits enzymkinetische Daten erhoben wurden (Stürzebecher *et al.*, 1983; Stürzebecher *et al.*, 1997; Stürzebecher *et al.*, 1995; Stürzebecher *et al.*, 1989). Ebenso bestehen etablierte Verfahren zum Eindiffundieren von Inhibitoren in Kristalle des bovinen Trypsins (Renatus *et al.*, 1998; Stubbs *et al.*, 1995).

Aufgrund der im Verlauf dieser Arbeit entstandenen, zum Teil sehr überraschenden Ergebnisse gliedert sie sich neben einem methodischen Teil in zwei Teilabschnitte.

- Methodisch stand zunächst das Etablieren eines Expressionssystems für rekombinante, bovine Trypsinvarianten, deren Rückfaltung zu biologisch aktivem Protein sowie deren Aufreinigung in für die Röntgenkristallographie geeigneter Menge und Reinheit im Mittelpunkt.
- Im ersten Teilabschnitt wurden die unter Abschnitt 1.4.7 aufgeführten Trypsinvarianten produziert und kinetisch bzw. röntgenkristallographisch charakterisiert.
- Aus den Ergebnissen des ersten Teilabschnitts der Arbeit basierend auf erschienenen bzw. eingereichten Publikationen (Abschnitt 3.1 und 3.2) ergaben sich eine Reihe interessanter Fragen, die zu weitergehenden und vertiefenden Untersuchungen der entdeckten strukturellen Flexibilitäten führten. Im zweiten Teilabschnitt wurden daher zur genaueren Charakterisierung einer der variierten Schleifen-Regionen zusätzliche Trypsinvarianten produziert und untersucht.

1.4.7 Verfahren zur Herstellung von Trypsinvarianten in ausreichender Menge für kinetische und kristallographische Charakterisierungen

Die einfache Handhabung bei geringen Kosten machte *Escherichia coli* bei dieser Arbeit zum Expressionssystem der Wahl. Bei der heterologen, cytoplasmatischen Expression kann es vorkommen, dass *E. coli* dazu tendiert, eukaryontische Proteine in einem nicht nativen und somit biologisch inaktiven Zustand in Einschlusskörperchen, sogenannten *Inclusion Bodies* (IBs), zu akkumulieren. Im Cytoplasma von *E. coli* herrscht zudem ein reduzierendes Milieu, das wiederum die Ausbildung von Disulfidbrücken verlangsamt (Derman *et al.*, 1993). Bovines Trypsin, ein eukaryontisches Protein, enthält sechs Disulfidbrücken; deshalb lagen die exprimierten Proteine als unlösliche, strukturell nicht einheitlich gefaltete und somit biologisch inaktive Fraktion vor. Die Bildung von IBs

bietet hingegen den Vorteil, große Mengen an Protein relativ unproblematisch aufzureinigen zu können. Mittels einer Renaturierungsstrategie gelang die erfolgreiche Rückfaltung von Trypsinvarianten mit Ausbeuten im Milligrammbereich (siehe Abschnitt 3.1, Seite 29).

Im folgenden sind die durch zielgerichtete Mutagenese erhaltenen Trypsinvarianten aufgeführt. Eine genauere Beschreibung von *Funktion* und *Struktur* des Faktor Xa sowie der *Spezifität von Serinproteasen* sind neben den Abschnitten 3.1 bis 3.5 auch in Abschnitt 1.4.2 aufgeführt (siehe auch **Abb. 1.4-1**)

Abb. 1.4-3 zeigt zur Verdeutlichung den schematischen Aufbau der Bindetaschen beider Enzyme.

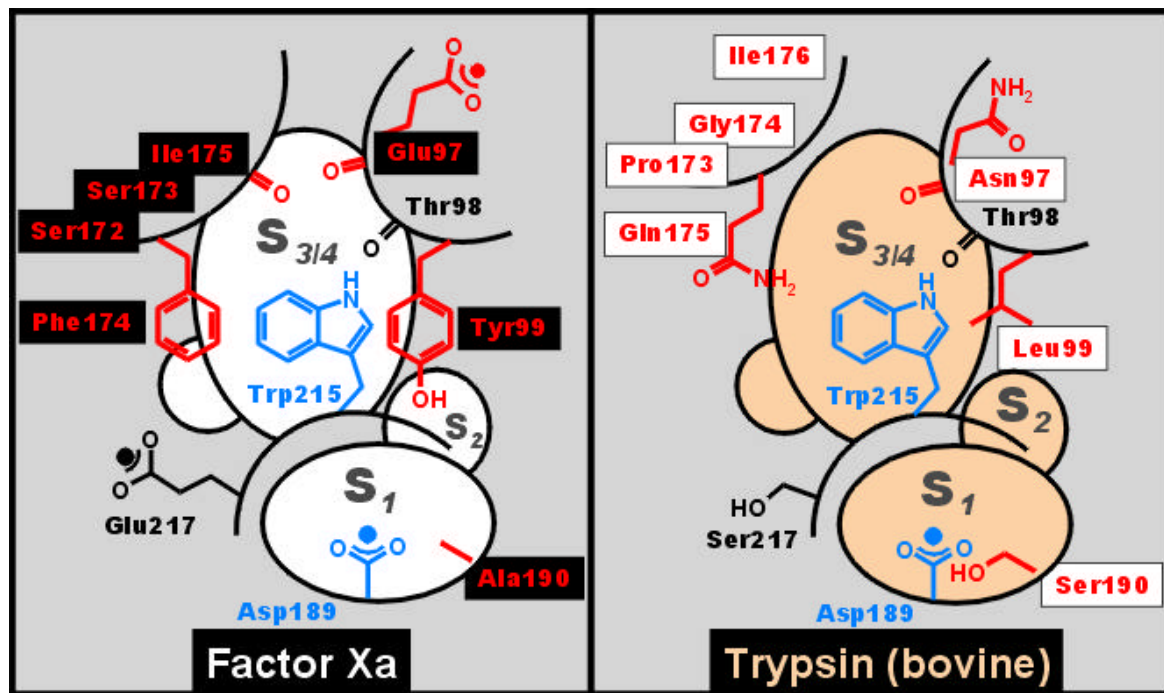


Abb. 1.4-3 Schematische Darstellung der Bindetaschen von Faktor Xa und Trypsin. In rot mit schwarz hinterlegt wurden Reste, die von Faktor Xa auf Trypsin übertragen wurden. Die Anordnung der drei aromatischen Aminosäureseitenketten Phe174, Trp216 und Tyr99 zu einer *aromatisch hydrophoben* Tasche sind für Wechselwirkungen mit Faktor Xa spezifischen Inhibitoren wichtig. Faktor Xa und Trypsin zeigen eine ähnliche primäre Spezifitätstasche (S1). Siehe auch Abschnitt 1.4.1.

Trypsinvarianten, welche die 175-Schleife (*Ser172*, *Ser173*, *Phe174*, *Ile175*) von Faktor Xa enthalten, weisen eine in den Abschnitten 3.2 und 3.3 (basierend auf Publikationen) näher beschriebene, strukturelle Änderung auf und verhalten sich bei Rückfaltungsexperimenten problematisch. Mittels der in Abschnitt 2.1 beschriebenen Hochdurchsatzmethode zum Auffinden bzw. Optimieren von Bedingungen für die *in vitro* Proteinfaltung konnte von diesen Trypsinvarianten durch Renaturierung biologisch aktives Protein in Milligramm-Mengen erhalten werden.

Tabelle 1-1 Die Tabelle zeigt Trypsinvarianten mit eingeführten Aminosäuren der Ligandenbindetasche von Faktor Xa. Aminosäuren links von der Sequenznummer entsprechen Trypsin, rechts die eingeführten Aminosäuren in der Faktor Xa-Sequenz.

Trypsinvarianten (erster Abschnitt)							
Variante	X(99)bT	X(190)bT	X(175)bT	X(99/190)bT	X(99/175)bT	X(175/190)bT	X(99/175/190)bT
Mutation	Asn97Glu Leu99Tyr	Ser190Ala	<div> <div>Tyr172Ser</div> <div>Pro173Ser</div> <div>Gly174Phe</div> <div>Gln175Ile</div> </div>	<div> <div>Asn97Glu</div> <div>Leu99Tyr</div> <div>Ser190Ala</div> </div>	<div> <div>Asn97Glu</div> <div>Leu99Tyr</div> <div>Tyr172Ser</div> <div>Pro173Ser</div> <div>Gly174Phe</div> <div>Gln175Ile</div> </div>	<div> <div>Tyr172Ser</div> <div>Pro173Ser</div> <div>Gly174Phe</div> <div>Gln175Ile</div> <div>Ser190Ala</div> </div>	<div> <div>Asn97Glu</div> <div>Leu99Tyr</div> <div>Tyr172Ser</div> <div>Pro173Ser</div> <div>Gly174Phe</div> <div>Gln175Ile</div> <div>Ser190Ala</div> </div>
			*SSFI				

Im zweiten Teil der Arbeit stand die nähere Charakterisierung der strukturellen Flexibilitäten der 175-Schleife im Interesse. Das in der 175-Schleife von Faktor Xa in Position 174 enthaltene Phenylalanin wurde insgesamt gegen vier weitere Aminosäuren ausgetauscht (**Tabelle 1-2**).

Tabelle 1-2 Trypsinvarianten mit Mutationen in der 175-Schleife

Trypsinvarianten (zweiter Abschnitt)				
Variante	X(SSYI)bT	X(SSWI)bT	X(SSAI)bT	X(SSRI)bT
Mutation	Phe174Tyr	Phe174Trp	Phe174Ala	Phe174Arg
Abkürzung	SSYI	SSWI	SSAI	SSRI


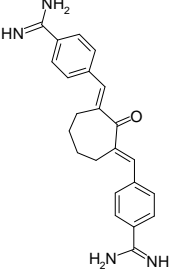
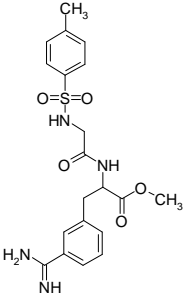
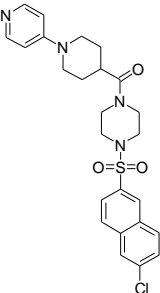
Zusätzlich wurde Ser217 des bovinen Trypsins gegen Glu217 (Faktor Xa) ersetzt, um den Einfluss dieses Restes auf die Stabilität der 175-Schleife zu untersuchen.

Tabelle 1-3 Trypsinvarianten mit zusätzlichen Mutationen in Position 217

Trypsinvarianten (zweiter Abschnitt)		
Variante	X(175/217)bT	X(99/175/190/217)bT
Mutation	<div><div>Tyr172Ser</div><div>Pro173Ser</div><div>*Gly174Phe</div><div>Gln175Ile</div><div>Ser217Glu</div><div>*SSFI</div></div>	<div><div>Asn97Glu</div><div>Leu99Tyr</div><div><div>Tyr172Ser</div><div>Pro173Ser</div><div>*Gly174Phe</div><div>Gln175Ile</div></div><div>Ser190Ala</div><div>Ser217Glu</div></div>

Die insgesamt 14 rekombinanten Varianten des bovinen Trypsins (inklusive rekombinant erhaltenes, natives, bovines Trypsin) wurden nach den in den Abschnitten 3.1, 3.2 und 3.3 (Publikationen 1-3) beschriebenen Methoden gegenüber ihres kinetischen Verhaltens mit den in **Tabelle 1-4** aufgeführten Inhibitoren charakterisiert.

Tabelle 1-4 Zur kinetischen und kristallographischen Charakterisierung verwendete Inhibitoren

Inhibitoren			
Benzamidin	ST353	ST800	Zeneca
2,7-bis(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-on	N ^ω -(2-tosylglycyl-3-amidino-D,L-phenylalanin-methylester	[4-(6-Chloro-naphthalen-2-sulfonyl)-piperazin-1-yl]--(3,4,5,6-tetrahydro-2H-1,4'-bipyridinyl-4-yl)-methanon	
			
schwach, unspezifisch	guter Inhibitor für Faktor Xa u. Trypsin	guter Inhibitor für Faktor Xa	spezifischer Faktor Xa Inhibitor

Neben der Analyse der Bindungsmoden kleiner Liganden, wurden auch zwei peptidische Serinproteasen-Inhibitoren zur strukturellen Charakterisierung der Trypsinvarianten verwendet (Aprotinin und Aprotinin-Arg15). Bovines Trypsin kristallisiert im Komplex mit den in Abschnitt 3.4 aufgeführten Liganden in anderen Kristallformen als mit den in **Tabelle 1-4** aufgeführten niedermolekularen Inhibitoren.

Der Einfluss von Kristallpackungen auf die Plastizitäten der 175-Schleife konnte so strukturell genauer charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von Komplexstrukturen, bestehend aus Trypsinvarianten und den vorstehenden Inhibitoren, gelöst. Eine Auswahl von 44 Strukturen, die z.T. auch Eingang in die in Abschnitten 3.1, 3.2 und 3.3 aufgeführten Publikationen gefunden haben, zeigt **Tabelle 5-1** (Seite 92).

Röntgenkristallographische Untersuchungen wurden am hauseigenen Röntgengenerator (Rigaku R300, R-Axis IV Image Plate) oder am *Deutschen Elektronen Synchrotron* (DESY) in Hamburg mit durch Kokristallisation erhaltenen Kristallen oder durch das Eindiffundieren von Inhibitoren in dafür geeignete Kristalle durchgeführt.

2 Methoden

Molekularbiologische, biochemische und röntgenkristallographische Methoden die in dieser Arbeit Anwendung gefunden haben, beruhen auf etablierten Standardmethoden aus der Literatur. Eine genauere Beschreibung der Methoden sind den Abschnitten 3.1 bis 3.5 zu entnehmen.

2.1 Hochdurchsatzmethode zum Auffinden bzw. Optimieren von Bedingungen für die *in vitro* Proteinfaltung

Wie bereits in Abschnitt 1.4.7 erwähnt, zeigten Trypsinvarianten mit eingeführter 175-Schleife aus Faktor Xa ein abweichendes Faltungsverhalten. Mit wenigen hundert Mikrogramm isolierten Proteins blieben die Ausbeuten weit hinter denen der anderen Trypsinvarianten zunächst zurück.

Aus zahlreichen Publikationen und Patenten ist bekannt, dass Proteinfaltung optimierbar ist (Gupta *et al.*, 1998; Lilie *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1996; Xie & Wetlaufer, 1996). Das Auffinden solcher Bedingungen bezüglich Proteinkonzentration, Temperatur, pH-Wert, die Verwendung von Additiven zum Verhindern der Aggregation sowie Additiven als Faltungshilfen, das Festlegen deren Konzentration etc. erfolgt dabei rein iterativ durch Austesten der jeweils besten Bedingungen.

Bei der *in vitro* Faltung von Serinproteasen haben sich niedermolekulare Inhibitoren als Faltungshilfen besonders bewährt (Light *et al.*, 1986; Mozhaev & Martinek, 1981; Odorzynski & Light, 1979; Sinha & Light, 1975).

Durch die Vielzahl der zu variierenden Parameter steht man vor der Optimierung eines mehrdimensionalen Problems, das eine große Anzahl von Experimenten erfordert. Die zur Faltung verwendeten und im Renaturierungspuffer enthaltenen Stoffe müssen nach der Faltung bzw. vor dem Testen auf Proteinaktivität quantitativ entfernt werden. Als Methode der Wahl hat sich dabei die Dialyse erwiesen. Der Renaturierungsansatz des Proteins wird gegen den Puffer, in dem die Aktivitätsbestimmung erfolgen soll, dialysiert. Nur wenn sichergestellt ist, dass alle diversen Rückfaltungsexperimente gleich behandelt werden, lassen sich relative Aussagen über einzelne Bedingungen treffen.

Zur Lösung des Problems, eine Vielzahl von Renaturierungsexperimenten reproduzierbar zu dialysieren und auf ihre in Folge des erfolgreichen Rückfaltungsprozesses messbare biologische Aktivität hin zu testen, wurde eine Methode zum Auffinden von Faltungsbedingungen bei hohem Probendurchsatz auf der Basis von genormten Mikrotiterplatten entwickelt.

Jede der verwendeten Mikrotiterplatten enthielt bis zu 96 unterschiedlich zusammengesetzte Renaturierungslösungen. Zur Faltung wurde unter Luftausschluss mit dem jeweiligen Protein (Trypsinvariante) bei der gewünschten Temperatur unter leichter Agitation (50-100 *rpm*) inkubiert. Die anschließende Dialyse erfolgte durch Verschluss der Oberseite der Mikrotiterplatte mit einer geeigneten Dialysemembran (hier 15 kD Ausschlussgröße) und Einbringen der so präparierten Mikrotiterplatte in den Dialysepuffer.

Nach der Dialyse erfolgte die Aktivierung der Faltungsprodukte mit Enterokinase und die Messung der Trypsinaktivität gegenüber eines chromophoren (Pefachrome-tPa¹⁰) oder fluorogenen (Z-Arg-AMC¹¹) Substrates mit Hilfe eines geeigneten Plattenlesegerätes (Plate Reader, IEMS¹²). Die errechnete Steigung der zeitlichen gemessenen Absorptionskurve diente dabei als Maß für die Aktivität des Renaturierungsansatzs bzw. für die relative Menge an korrekt gefaltem Trypsin.

¹⁰ CH₃SO₂-D-HHT-Gly-Arg-pNA*AcOH, (Loxo GmbH, Dossenheim, Germany)

¹¹ Z-Arg-Aminomethylcumarin, (SIGMA)

Ausgehend von aufgefundenen oder bereits bekannten Rückfaltungsbedingungen konnte durch weitere *Screening*-Experimente eine zusätzliche Optimierung erreicht werden. Die jeweiligen Schritte der Renaturierung, Dialyse, Aktivierung sowie optischen Aktivitätsmessung wurden in derselben Mikrotiterplatte durchgeführt. Das Übertragen der optimierten Bedingungen auf präparative Verhältnisse (700-1000 ml) erwies sich als unproblematisch.

Die Vorzüge der Mikrotitertechnik, geringe Volumina (100-200 µl je Einzelexperiment) bei hohem Durchsatz, Automatisierung und hoher Geschwindigkeit der Messungen, konnten auf das dargestellte Problem zum Auffinden bzw. Optimieren von Bedingungen für die *in vitro* Proteinfaltung übertragen werden. Als Ergebnis resultierte eine Zeit- und Kostenersparnis bei einfacher Handhabung.

2.2 Puls-Renaturierung

Besonders für die Renaturierung der Varianten mit „problematischer“ 175-Schleife wurde ein Rückfaltungssystem angewendet, das die Injektion der solubilisierten Einschlusskörper in zeitlichen Intervallen erlaubt. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Schlauchpumpe) wurde durch eine Zeitschaltuhr in Abständen von 30 Minuten eine genau definierte Menge Protein in den Renaturierungspuffer injiziert (die zeitlichen Abstände orientieren sich an zuvor experimentell bestimmten Faltungshalbwertszeiten). Wurde dieser Vorgang ca. 30 mal wiederholt und mit den in Abschnitt 2.1 gefundenen Bedingungen kombiniert, erhielt man Proteinmengen, die um den Faktor zehn höher lagen als bei der Methode die in Abschnitt 3.1 (Publikation 1) beschrieben wird. Interessanterweise führte diese Methode ausschließlich bei den angesprochenen „problematischen“ Mutanten zu einer Steigerung der Ausbeute. Vermutlich liegt bei Trypsinvarianten mit veränderter 175-Schleife eine andere Faltungskinetik zugrunde. Eine genauere Charakterisierung, wie etwa mit Hilfe von Schmelzkurven oder Fluoreszenzexperimenten zur Proteinfaltung und Denaturierung, wurde nicht verfolgt.

¹² Thermo Labsystems, Finnland

3 Ergebnisse und Diskussion

Die entsprechenden Ergebnisse aus Teil eins der Arbeit sind in den Abschnitten 3.1 und 3.2 zusammengefasst. Ergebnisse des zweiten Teils der Arbeit finden sich in Abschnitt 3.3. Die Publikationen übergreifende Ergebnisse sind in den Abschnitten 3.4 und 3.5 aufgeführt.

3.1 Trypsin Mutants for Structure-Based Drug Design: Expression, Refolding and Crystallisation¹³

3.1.1 Abstract:

New techniques in drug discovery are essential for the fast and efficient development of novel innovative drugs to deal with the challenges of the future. Structure determinations of various members of serine proteinases have provided a basis for computer-based drug design within this class of enzymes. In many proteins of interest, however, this course is blocked through a lack of suitable crystals. As a strategy for circumventing such problems, we have investigated the use of surrogate proteins for studying protein-ligand interactions. To test the feasibility of this approach, we have chosen bovine trypsin as a scaffold to reconstruct the ligand binding site of factor Xa. The simple modular design of trypsin, its readiness to crystallise and straightforward handling lends itself to such drug design by proxy. The expression, folding, purification, crystallographic and kinetic characterisation of bovine trypsin forms with factor Xa phenotype are presented.

Keywords:

Crystal structure/ inhibitor/ Factor Xa/ Structural genomics

¹³ Daniel Rauh, Sabine Reyda, Gerhard Klebe & Milton T. Stubbs (2002), **Biol. Chem.**, Vol. 383 (7), 1309-1314

3.1.2 Introduction

The rapid completion of the genome sequence from man and other organisms has shifted the focus to the characterisation of proteins and determination of their functions and roles in disease processes. These results and the spectacular contribution of three-dimensional structural information to the understanding of protein functions have led to a major initiative in structural genomics (Thornton *et al.*, 2000). New techniques, methods and ideas in drug discovery are essential to utilise this information for fast and efficient development of novel drugs in the light of this genomic background.

The crystal structure of a target protein is of great benefit in modern drug design. In particular, the structure of a drug target in complex with its ligand(s) provides important information about the geometry of the binding site, invaluable for understanding the determinants of selectivity and specificity in protein-ligand interactions. New approaches in X-ray crystallography have made structural determinations faster and more accessible (Heinemann *et al.*, 2001). However, many proteins of interest for modern drug design are not always structurally characterised and the determination of high-resolution structures by X-ray crystallography or NMR spectroscopy still poses a number of problems. In particular, protein crystallisation remains a hurdle to structure-based drug design, hence a major strategy of the present structural genomics project is the establishment of representative structures for every class of protein fold (Heinemann *et al.*, 2000). These representatives should allow the modelling of remaining proteins by homology (Sanchez *et al.*, 2000), providing important clues as to function. Problems such as modelling of loops and distortions as well as side chain flexibility still remain (Sanchez *et al.*, 2000). The lack of predictive power at the atomic level is of serious concern since in biology atomic details are crucial (Hol, 2000). Finally, the quality of a homology model is difficult to ascertain, especially when demanding the accuracy necessary for docking problems in drug design (Schafferhans & Klebe, 2001).

We have developed a novel strategy to mimic the ligand binding region of a pharmaceutically important protein by the introduction of its binding site into a related prototype enzyme of known structure, allowing structural analysis of the binding region of the target enzyme and the design of new drugs against it (Reyda *et al.*, 2003). As many important biological and pathological processes are under the control of serine proteinases (such as blood coagulation, fibrinolysis, the kinin-kallikrein system or the complement system), their regulation is a suitable method for potential therapies.

Structure determinations of diverse members of this family (e.g. trypsin, thrombin, factor Xa, tPa and urokinase) have provided a basis for drug design (Mackman *et al.*, 2001; Nar *et al.*, 2001; Nienaber *et al.*, 2000a; Renatus *et al.*, 1998; Sperl *et al.*, 2000a; Sperl *et al.*, 2000b; Stubbs & Bode, 1993). To learn more about the determinants of protein-ligand interactions and the origin of specificity and selectivity in serine proteinases (Renatus *et al.*, 1998), we have been using trypsin as a model system.

As proof of principle, we have selected the trypsin-like serine proteinase factor Xa to investigate the feasibility of transferring the binding site of a target proteinase to a related enzyme. Factor Xa acts at an early step in the blood coagulation system and holds a central position that links the intrinsic and extrinsic mechanisms in the coagulation cascade (Davie *et al.*, 1991). A strategic control of blood clotting in the treatment and prevention of thromboembolic diseases via factor Xa activity by the use of low molecular weight inhibitors is generally accepted as a valuable therapeutic concept (Hirsh & Weitz, 1999).

The structure of factor Xa is known in complex with a variety of inhibitors, and several have also been examined bound to trypsin (Brandstetter *et al.*, 1996; Maignan *et al.*, 2000; Nar *et al.*, 2001; Padmanabhan *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 2001; Stubbs *et al.*, 1995). All inhibitors studied so far occupy the “unprimed” binding pockets (**Figure 3.1-1**). Characteristic of factor Xa inhibitors is a three-point interaction: binding in the primary specificity pocket S1, the hydrophobic S3/S4 pocket (formed by Tyr99, Trp215 and Phe174) and a distal electrophilic pocket (formed by the carbonyl groups of Glu97, Thr98 and Ile175) (Brandstetter *et al.*, 1996; Stubbs *et al.*, 1995).

We have introduced the binding site of factor Xa into rat trypsin and investigated the interaction of various factor Xa inhibitors (Reyda *et al.*, 2003). The rat trypsin variants with factor Xa phenotype yielded crystals that were not generally suitable for soaking experiments, however; soaking led to the displacement of bound benzamidine molecules integrated in the crystal lattice, resulting in non-diffracting crystals. In this paper, we describe the use of bovine trypsin (for which a large amount of kinetic data are available (Stürzebecher *et al.*, 1983; Stürzebecher *et al.*, 1997; Stürzebecher *et al.*, 1995; Stürzebecher *et al.*, 1989)) as scaffold. The crystallisation of bovine trypsin in a soaking form allows a rapid turnover for the study of ligand complexes. Mutant variants of bovine trypsin were made by site directed mutagenesis and large amounts of protein could be produced in *E. coli* via refolding from insoluble inclusion bodies (IBs). As a first step, we have introduced the 99- and 190-loops of factor Xa into bovine trypsin (**Figure 3.1-1**). The 99-loop was

constructed via the two residue replacement (Glu97Asn, Tyr99Leu) to form one part of the hydrophobic pocket of factor Xa. Within the primary specificity pocket S1, Ser190 was replaced by an Ala, the only difference between trypsin and factor Xa in this region.

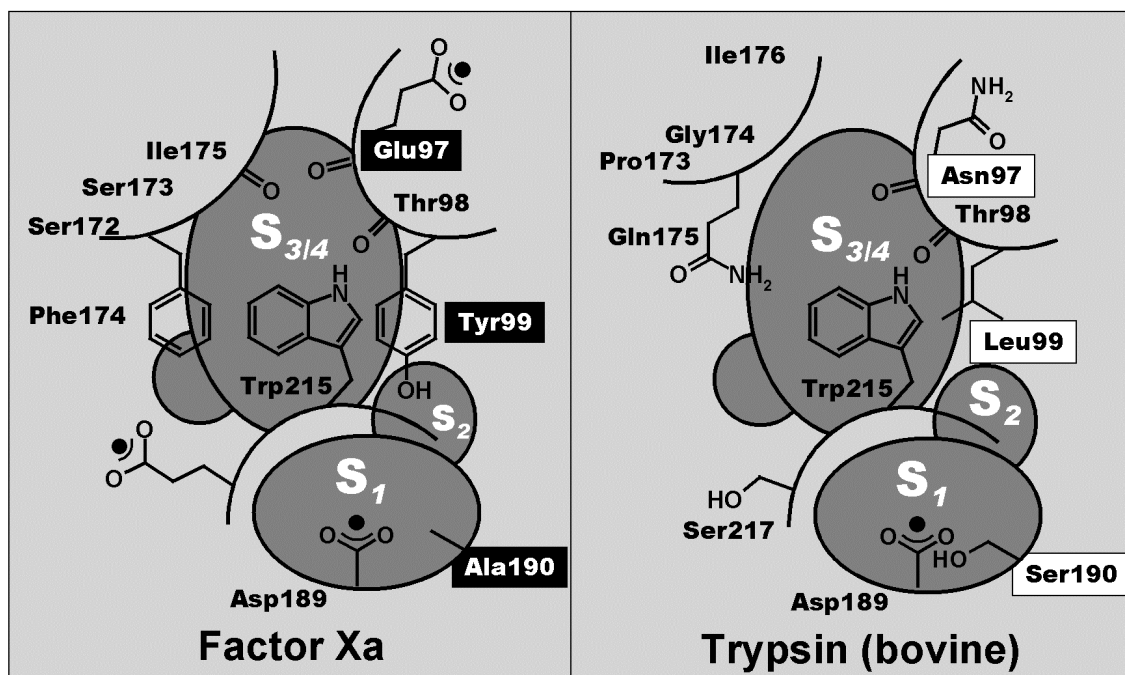


Figure 3.1-1. Schematic representation of the binding sites of factor Xa and trypsin. Highlighted residues were exchanged in bovine trypsin to form variants X99bT, X190bT and X(99/190)bT.

Four trypsin variants were cloned, overexpressed and successfully refolded. In order to find suitable conditions for the refolding of trypsinogen, pH, protein concentration, temperature, redox system, and additives (such as glycine, glycerol and arginine) that can enhance native structure or inhibit aggregation were all varied. Refolding solutions with concentrations of trypsinogen higher than 30 µg/ml markedly decreased the renaturation efficiency. However, the stepwise addition of protein to the refolding buffer increased the total amount of refolded protein by keeping the volume of the refolding solution relatively low. It is known that refolding of proteins containing many disulphide bonds is often of low efficiency due to inappropriate disulphide bond formation (Rudolph *et al.*, 1996). Likewise, fully reduced trypsin has a great tendency to form high-molecular aggregates (Light *et al.*, 1986; Odorzynski & Light, 1979). In our case, aggregation was reduced by adding 700 mM of L-arginine-HCl (Rudolph & Lilie, 1996), 100 mM of boric

acid and 60 mM calcium chloride (Mozhaev & Martinek, 1981) and by lowering the temperature to 4°C. This has also been achieved by a stepwise renaturation using 8 M and 560 mM guanidine hydrochloride (Peterson *et al.*, 2001). Folding and activation of the trypsin variants with bovine enterokinase was monitored by the cleavage of N- α -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (Mole & Horton, 1973). Affinity purification of the trypsin forms (**Figure 3.1-2**) led to preparations suitable for further kinetic and crystallographic analysis.

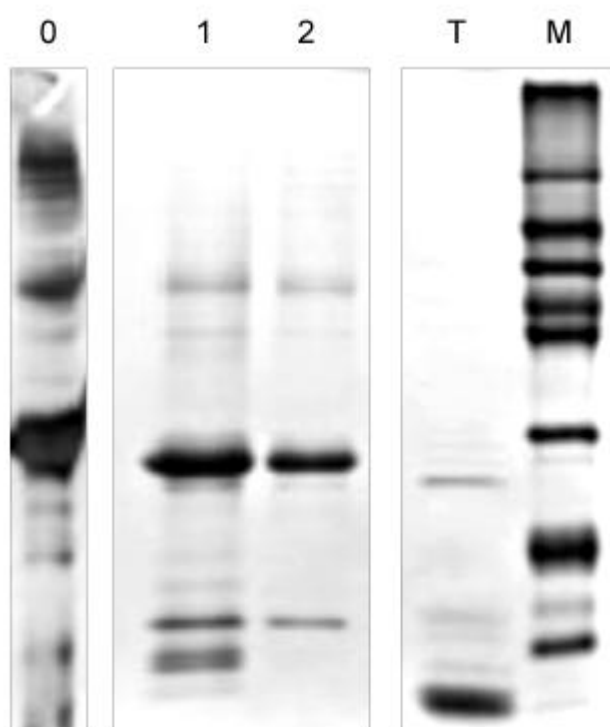


Figure 3.1-2. Polyacrylamide gel electrophoresis analysis of bovine trypsinogen expression and inclusion body purification


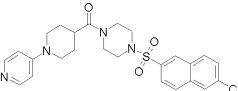
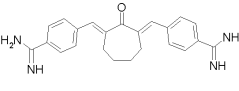
0: Cell extract; 1: initial inclusion body purification; 2: second inclusion body purification; T: bovine trypsin (SIGMA); M: midi range marker

Methods: cDNA coding for bovine trypsinogen was kindly provided by T. Okajima and S. Goto of Kinki University, Japan. The mature protein encoding 736-bp was modified with an N-terminal His-Tag containing 6 His and generated by PCR. The following primers were used (5'-GAG AGG TAC CAT ATG CAC CAT CAC CAT CAC CAT TTC CCC GTG GAC GAT GAT forward) and (5'-GAG AGT CGA CGG ATC CTT AGT TGG AGG CGA TGG TCT G reverse) resulting in two cohesive ends with BamHI, SalI sites at the 5' end and NdeI, KpnI sites at the 3' end. The PCR product and the pUC18 vector were restricted with KpnI and SalI, purified and ligated with T4 DNA ligase. The cloning vector was used to transform *E. coli* strain XL2-competent cells. NdeI/KpnI fragments were inserted into the NdeI/BamHI sites of the IPTG inducible T7 expression vector pET3a. The expression plasmid carrying the insert was used to transform *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS-competent cells, which carries an integrated

copy of the T7 RNA polymerase gene under the control of the inducible lacUV5 promoter. Transformed cells were grown at 37°C in Lauri-Bertani medium to a cell density of $OD_{600} = 0.6$. The expression was induced by IPTG, and incubation was continued for 4 h at 37°C. Cells were pelleted and resuspended in sample buffer, and the cell extract was analysed by SDS-Page.

Inclusion body purification was performed according to published procedures (Rudolph *et al.*, 1996) with some modifications. The washed and pelleted inclusion bodies were suspended in 6 M guanidine hydrochloride pH 8.0, 100 mM dithiothreitol and incubated for 45 min at room temperature to reduce disulphide bridges and to dissolve the inclusion bodies. The dissolved protein was dialysed twice against 4 M guanidinium hydrochloride, 10 mM HCl. After the dialysis, the pH was lowered to 3.0 and stored at -20°C. Refolding was performed by oxido-shuffling as described (Rudolph *et al.*, 1996). After purification, the fully reduced recombinant protein was diluted into the refolding buffer to give a final protein concentration of 30 µg/ml. The diluted protein was kept at 4°C with gentle shaking for 48 h. The refolded trypsinogen was activated to trypsin by incubating with bovine enterokinase; activated trypsin was purified and concentrated by FPLC using soybean trypsin inhibitor covalently bound to agarose (Hedstrom *et al.*, 1996).

Table 3.1-1. Results of Kinetic Measurements. Determination of K_M and K_i values.

	K_M [µM]			
		1	2	3
bovine trypsin	23.0	39.0	13.4	0.4
X190bT	44.3	34.0	8.0	0.3
X99bT	34.2	36.0	2.3	0.7
X(99/190)bT	84.4	53.0	0.9	0.9
factor Xa	63.6	160.0	0.016	0.023

All kinetic measurements were performed in 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 154 mM NaCl, 5% ethanol as described (Stürzebecher *et al.*, 1989). Enzyme activity was quantified by measuring the rate of hydrolysis of the chromogenic substrate Pefachrome-tPa (CH_3SO_2 -D-HHT-Gly-Arg-pNA*AcOH) using a plate reader IEMS (Thermo Labsystems, Finland) at 405 nm. Each measurement was done in triplicate. K_M values for each mutant were measured with 8 different substrate concentrations. The degree of inhibition K_i was determined for each inhibitor concentration by plotting $1/v$ against the concentration of the inhibitor. **(1)**: benzamidine, unspecific, weak inhibition of both trypsin and factor Xa, better for trypsin; **(2)**: [4-(6-Chloro-naphthalene-2-sulfonyl)-piperazin-1-yl]-(3,4,5,6-tetrahydro-2H-1,4'-bipyridinyl-4-yl)-methanone, specific for factor Xa; **(3)**: 2,7-bis(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one, unspecific, strong inhibition for trypsin and factor Xa, slightly better for factor Xa.

All mutants could be activated by bovine enterokinase, and show activity towards the chromogenic substrate Pefachrome-tPa (Loxo GmbH, Dossenheim, Germany) at 25°C. As shown in **Table 3.1-1**, the K_m -values are intermediate to those of native bovine trypsin and factor Xa. The inhibition data for inhibitor **2** show an increase in affinity on approaching the factor Xa phenotype, i.e. insertion of the 99- and 190-loops. The replacement of the hydrophilic residue Ser190 by Ala is thought to result in a more hydrophobic environment favourable for the burial of the chloronaphthyl moiety of **2** (Stubbs *et al.*, 2002) (see **Figure 3.1-4**).

The inhibition data of inhibitor **3** show no significant difference between bovine trypsin and its variants. This is in contrast to rat trypsin variants, where introduction of Tyr99 resulted in a significantly higher affinity (Reyda *et al.*, 2003). In rat trypsin, binding of **2** results in a side chain reorientation of Tyr217 (Ser217 in bovine trypsin), that together with Tyr99 and Trp215 forms an aromatic pocket *almost* isostructural to that found in factor Xa. This potentially favourable introduction could therefore provide an explanation for the observed differences between rat and bovine trypsin variant inhibitions.

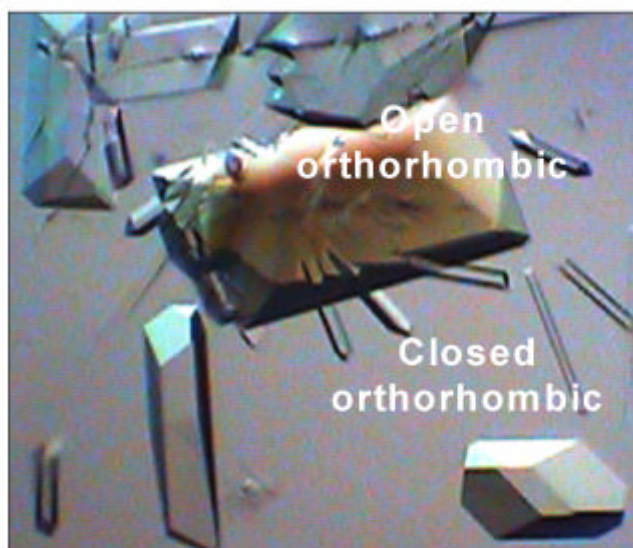


Figure 3.1-3. Crystal forms of X(99/190)bT:

Recombinant bovine trypsin and its mutants were preincubated with benzamidine in 1.0 mM HCl, 10.0 mM CaCl_2 for 1 h. Droplets of the protein inhibitor solution and the reservoir solution (2 volumes crystallisation buffer, one volume 0.2% sodium azide) were incubated using vapour diffusion overnight. The reservoir buffer was replaced by the crystallisation buffer (1.9 M ammonium sulphate, 50 mM MES, pH 6.0). After another hour of equilibration, the hanging drop was either macro or micro seeded with native 'open' crystals (Renatus *et al.*, 1998; Stubbs *et al.*, 1995). Crystals of the open form grew within one day at room temperature. Trigonal and 'closed' orthorhombic crystals also grew spontaneously.

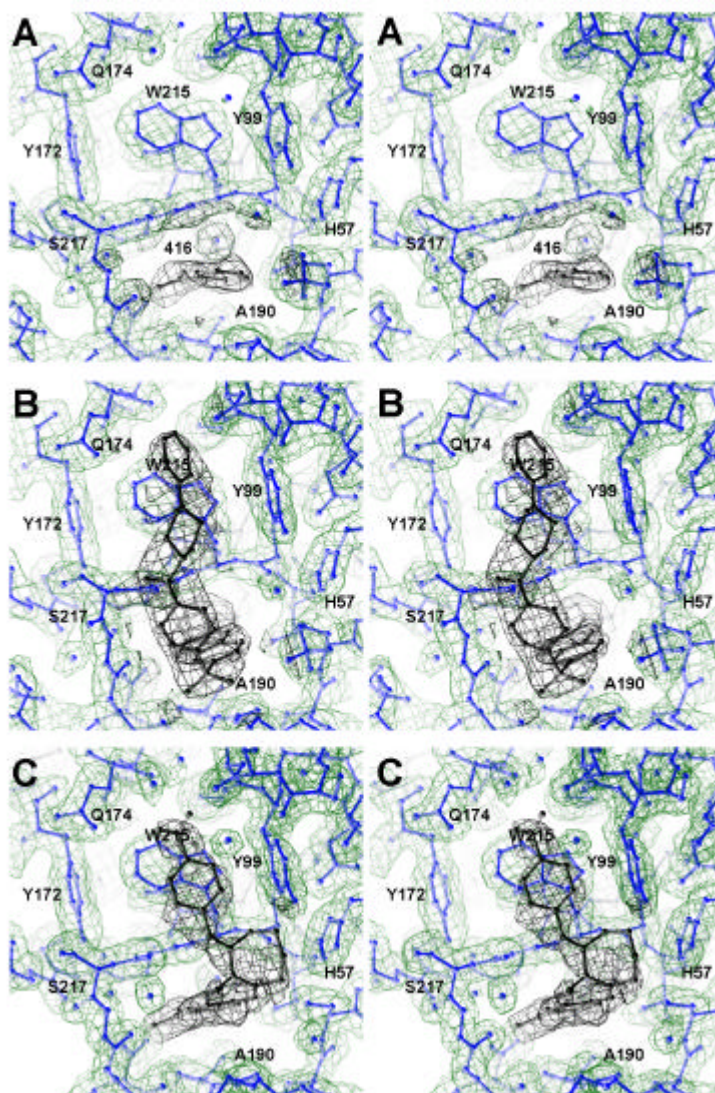


Figure 3.1-4. Experimental electron densities for inhibitors **1**, **2** and **3** in the active site of X(99/190)bT.

(A) The basic benzamidine inhibitor **1** is buried in the modified S1 specificity pocket containing Ala190. The amidino function of the inhibitor makes a symmetric salt bridge with the carboxylate of Asp189. The mutated side chain of Tyr99 is perpendicular to that of Trp215 as observed in factor Xa (Padmanabhan *et al.*, 1993); the side chain of Glu97 is disordered (not shown).

(B) The chloronaphthyl moiety of inhibitor **2** occupies the S1 pocket, while the pyridinyl group runs towards the S3/S4 pocket. Water molecule 416 is displaced by the chlorine atom, and the Ser217-Gly219 peptide bond flips by 120° compared to the benzamidine structure (cf. **Figure 3.1-4A**). The Tyr99 phenolic group rotates by 30° to approach the inhibitor more closely.

(C) The symmetric inhibitor **3** binds with its proximal benzamidino group buried in the primary specificity pocket to form a salt bridge to Asp189. The distal benzamidino group reaches out toward the S3/S4 pocket.

Recombinant bovine trypsin and variants crystallise under the same conditions as wild type enzyme, resulting in equivalent crystal forms (**Figure 3.1-3**). Seeding techniques using native bovine trypsin microcrystals in the presence of benzamidine (inhibitor 1) resulted in the open orthorhombic crystal form suitable for soaking experiments for all mutants (**Table 3.1-2**) (Stubbs *et al.*, 1995). These crystals diffract to high resolution and allow soaking of diverse inhibitors (**Figure 3.1-4**).

The crystal structure of inhibitor **2** soaked into X(99/190)bT (**Figure 3.1-4B**) reveals the occupation of the primary specificity pocket S1 by the chloronaphthyl group of the inhibitor, as well as favourable stacking interactions between the distal pyridinyl group of **2** and the side chain of Tyr99 (which rotates 30° in χ_2 with respect to the benzamidine structure). As observed previously for bovine trypsin (Stubbs *et al.*, 2002) and rat trypsin variants (Reyda *et al.*, 2003), the chlorine atom of **2** displaces buried water molecule 416. The presence of Ala190 removes the need for a reorientation of the native trypsin Ser190 hydroxyl function (Stubbs *et al.*, 2002). The peptide bond between Ser217 and Gly 219 flips 120° to expose its hydrophobic edge towards that of the inhibitor.

We were also able to determine the structure of X(99/190)bT soaked with inhibitor **3**, which was not possible with the rat trypsin variant crystals (Reyda *et al.*, 2003) (**Figure 3.1-4C**). The inhibitor binds predominantly in the E/Z-configuration as observed previously (Renatus *et al.*, 1997; Renatus *et al.*, 1998), in contrast to the proposed Z/Z-configuration (Phillips *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1998). The distal (S3/S4 site) benzamidinyl group of **3** is oriented parallel to Trp215 and perpendicular to Tyr99 (which also rotates by 30° with respect to X(99/190)bT. In native bovine trypsin, the plane of this ring is at an angle of ca. 45° to that of Trp215 (Renatus *et al.*, 1998). This inhibitor has been examined in tissue type plasminogen activator (Renatus *et al.*, 1997), which also possesses a Tyr at position 99. In the latter structure, an equivalent parallel/perpendicular stacking of rings is observed, confirming the convergence of our mutant-ligand complex structures with known targets.

In summary, we have established an experimental system for the structural and physicochemical analysis of factor Xa inhibitors in trypsin variants. The further analysis of remaining mutants containing the 175-loop, leading to the completion of the binding site of factor Xa, will allow investigation of determinants for specificity and selectivity in protein ligand interactions. This approach can be applied to other serine proteinases for which structural information is not yet available and could also be of relevance to other systems.

Table 3.1-2. Data Collection and Refinement Statistics

	X(99/190)bT / 1	X(99/190)bT / 2	X(99/190)bT / 3
space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
cell constants (Å)	63.6 69.1 63.3	63.0 69.0 63.7	63.8 69.3 63.1 90.0
observed/ unique reflections	48652/12504	40043/11183	103631/30411
R _{sym}	9.8 %	15.1 %	9.2%
Refinement			
reflections (completeness)	12334 (96.5%) 10 to 2.3 Å	10989 (98.7%) 10 to 2.4 Å	22103 (98.3%) 10 to 1.9 Å
number of non hydrogen atoms			
per asymmetric unit			
protein	1633	1633	1633
ions	Ca ²⁺ + SO ₄ ²⁻	Ca ²⁺ + SO ₄ ²⁻	Ca ²⁺
solvent	75	58	79
inhibitor	9	34	28
rms deviation			
bond	0.008	0.009	0.008
angles	2.107	1.911	1.806
R _{fac}	19.4% 10-2.3 Å	21.3% 10-2.4 Å	20.4% 10-1.9 Å
$R_{sym} = \sum I - \langle I \rangle / \sum I$			

Crystals were mounted in capillaries and data were collected in house using an R-AxisIV image plate system (MSC, Texas) installed on a Rigaku rotating anode generator; data were evaluated using DENZO (Otwinowski & Minor, 1997). Starting coordinates were taken from the Protein Data Bank (pdb code 1mts). Conventional crystallographic refinement (rigid body, positional, temperature factor) was carried out using XPLOR (Brünger, 1992). Molecular models of the inhibitors **1**, **2** and **3** were constructed using SYBYL (Tripos Associates) and model building performed using O (Jones *et al.*, 1991). Target values for bond length and angle refinement of the inhibitors were those obtained after conjugate gradient energy minimisation in SYBYL; planarity constraints were applied only weakly, while all dihedral angles were left free to rotate.

Acknowledgements

The authors would like to thank Professors T. Okajima and S. Goto of Kinki University, Japan for providing us with the cDNA of bovine trypsinogen, Christian Sohn for expert technical assistance and Dr. Jörg Stürzebecher for providing inhibitor (**3**). Financial support was provided by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Graduiertenkolleg “Protein function at the atomic level”.

3.2 ZZ made EZ: Influence of inhibitor configuration on enzyme selectivity¹⁴

3.2.1 Abstract

Selectivity of drug targeting is necessary in order to forestall undesired side effects. In this paper, we examine the structural grounds for the configuration-dependent selectivity of 2,7-bis(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one (**1**) for factor Xa and trypsin. Using engineered trypsin variants, we find similar overall binding modes for the (E,Z) and (Z,Z) configuration isomers. Minor changes in van der Waal's contacts explain the differential inhibition of factor Xa. We note differences in the experimental electron densities observed from co-crystallisation and soaking experiments, which have important ramifications for the structural interpretation of protein-ligand interactions.

Key words:

Crystal structure / Factor Xa / inhibitor / configuration / drug design

¹⁴ Daniel Rauh, Gerhard Klebe, Jörg Stürzebecher & Milton T. Stubbs, **J. Mol. Biol.**, eingereicht

3.2.2 Introduction

In the modern quest for novel therapeutics, it has become relatively straightforward to develop a lead compound with sufficient affinity to the intended target to block its action *in vitro*. Far more difficult is the production of a drug: in addition to being non-toxic, a drug should have high bioavailability and negligible side effects (Hauptmann & Stürzebecher, 1999). One possible cause of side effects is cross reactivity of the compound in question due to a lack of selectivity for the desired target. Considering that many enzymes and receptors belong to large protein families of similar structure and function, achieving selectivity can be a major undertaking. Determinants for selectivity are as yet poorly understood – often, minor changes in chemical composition can result in large differences in the relative inhibition of related enzymes (Böhm *et al.*, 1999; Dixon & Villar, 1998).

We have focused our attention on the class of trypsin-like serine proteinases as a model system for understanding protein – ligand interactions. This family of enzymes has been particularly well studied: structural data is available for many representatives, both in the presence and absence of bound ligands, and a wide range of inhibitors have been characterised kinetically due to their roles in many disease processes (Leung *et al.*, 2000; Walker & Lynas, 2001). It therefore represents an ideal system for investigating factors affecting affinity and selectivity of inhibitors.

In particular, we have examined the structural grounds behind the selectivity of factor Xa inhibitors using trypsin as surrogate (Renatus *et al.*, 1998; Stubbs *et al.*, 1995; Stubbs *et al.*, 2002). Trypsin and factor Xa exhibit similar structures in the neighbourhood of the primary specificity pocket, while the ligand binding site of factor Xa is characterised by an aromatic box encompassed by Trp215, Tyr99 and Phe174 (**Figure 3.2-1**). Transplanting the binding site of factor Xa into rat trypsin resulted in a factor Xa-like inhibition profile (Reyda *et al.*, 2003). Introduction of the chain segment containing Phe174 (the 175-loop) into rat trypsin lead to an unexpected structural plasticity of the variant. To investigate this phenomenon further, we have begun to introduce the equivalent region into bovine trypsin (Rauh *et al.*, 2002). In this paper, we describe the completion of the binding site, and compare and contrast the effect of combining the three regions differing between factor Xa and trypsin.

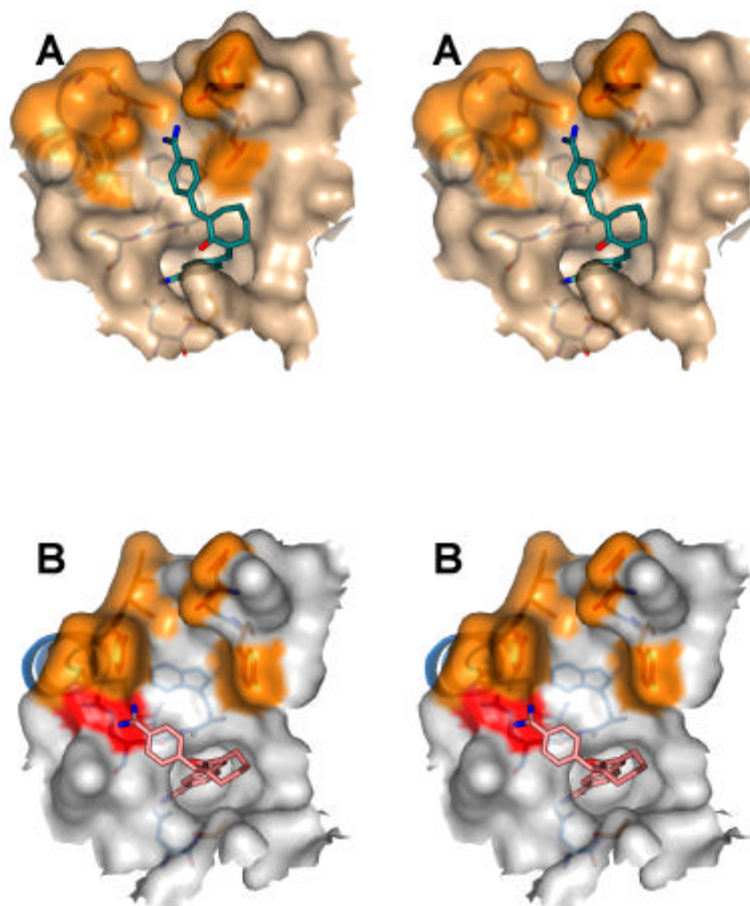


Figure 3.2-1. (A) Binding mode of the (E,Z)-isomer of **(1)** in co-crystals with bovine trypsin (Renatus *et al.*, 1998). The inhibitor binds in an extended conformation, with the 'proximal' benzamidino function occupying the primary specificity site, where it forms a salt bridge to Asp189. The 'distal' benzamidino group is found in the S3/S4 pocket, surrounded by residues Trp215 at the base, Leu99 to the 'east', and Gln175 to the 'west'. (B) Modelled binding mode of the (Z,Z)-isomer to the active site of factor Xa according to Berlex (Shaw *et al.*, 1998). In contrast to the (E,Z)-binding mode, in which the distal benzamidino function would occupy the aromatic box formed by Trp215, Tyr99 and Phe174, the distal amidino moiety is proposed to form a salt bridge to Glu217 in the 'west' (red). Trypsin variants described in this study involved introduction of the aromatic box of factor Xa into trypsin (orange in (A) and (B)). Figure prepared using PyMol (DeLano, 2002).

As a measure of validity of this approach, we have examined the affinity of the variants for 2,7-bis(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one **(1)**. This is a potent inhibitor of factor Xa (K_i 13nM) (Stürzebecher *et al.*, 1989), which binds to trypsin in an extended conformation (Renatus *et al.*, 1998). The co-crystal structure in trypsin revealed the inhibitor to possess the (E,Z)-configuration, with one benzamidinyl function filling the

primary S1 binding pocket (the ‘proximal’ benzamidine), while the second would occupy the aromatic box of factor Xa (the ‘distal’ group). A crystallographic study of **(1)** in complex with human tissue plasminogen activator, which also possesses Tyr99, revealed a similar binding mode (Renatus *et al.*, 1997).

The Berlex group (Phillips *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1998) has shown that photoisomerisation of **(1)** results in three forms – (E,E), (E,Z) and (Z,Z). The (E,E) form binds weakly to both factor Xa (17µM) and trypsin (280nM), while the (E,Z) and (Z,Z) configurations bind equally well to trypsin, with K_i values ~30nM. Factor Xa is preferentially inhibited by the (Z,Z) form, with a K_i of 0.7nM as opposed to 200nM for (E,Z). To explain this, the (Z,Z) form was modelled to the binding site of factor Xa (Shaw *et al.*, 1998), postulating that it bound in a ‘U’-shape with the distal basic function forming a surface located salt bridge with factor Xa Glu217 (**Figure 3.2-1**).

This latter binding mode is at odds with our (Gabriel *et al.*, 1998; Renatus *et al.*, 1998; Stubbs *et al.*, 1995; Stubbs *et al.*, 2002) and other’s (Brandstetter *et al.*, 1996; Kamata *et al.*, 1998; Maignan *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2002; Sperl *et al.*, 2000a) structural data for factor Xa, which invariably show occupation of the aromatic box. Indeed, this model even contradicts Berlex’s own development compounds (Ng *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2000). In order to resolve this question, we have studied the crystal structures of **(1)** in isolation, in trypsin, and in trypsin variants containing the aromatic box.

3.2.3 Materials and Methods

Synthesis and crystal structure determination of **(1)**

The inhibitor **(1)** was synthesised as described (Wagner *et al.*, 1977). All experiments were carried out using the same batch as used previously for rat (Reyda *et al.*, 2003) and bovine (Rauh *et al.*, 2002) trypsin variants. Compound **(1)** was dissolved in a water:methanol mixture, and a 10µl drop placed over an empty crystallisation well and allowed to evaporate slowly. Yellow prismatic crystals grew within a few days, a single crystal was mounted on a glass fibre and measured at room temperature on a Rigaku AFC5R diffractometer with graphite monochromated $\text{CuK}\alpha$ radiation from a Rigaku RU300 rotating anode generator. The crystal belongs to the centrosymmetric primitive triclinic space group P(-1), with cell dimensions $a = 10.101(2) \text{ \AA}$, $b = 12.667(2) \text{ \AA}$, $c = 9.947(2)$

\AA , $\alpha = 107.93(1)^\circ$, $\beta = 102.43(1)^\circ$, $\gamma = 98.30(1)^\circ$. A total of 3661 reflections were collected to 0.89 \AA resolution, of which 3436 were unique, with an R_{int} of 0.14. The structure was solved by direct methods and expanded using Fourier techniques. Non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Hydrogen atoms were included, but their positions were not refined; isotropic B values were refined. The final cycle of full-matrix least-squares refinement was based on 3436 observed reflections and 306 variable parameters and converged (largest parameter shift was 0.03 times its esd) with unweighted and weighted residual factors of $R = \Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o| = 0.13$, $R_w = \sqrt{\Sigma w(|F_o| - |F_c|)^2 / \Sigma w F_o^2} = 0.13$. The asymmetric unit consists of 28 non-hydrogen inhibitor atoms, 20 hydrogen atoms from the inhibitor, two water molecules and two chloride ions. All calculations were performed using the teXsan crystallographic software package (Molecular Structure Corporation, Texas, USA).

Preparation of mutants

Wild-type cationic bovine trypsin and variants were cloned, expressed, purified and refolded as described (Rauh *et al.*, 2002). Mutagenesis was performed by site-directed mutagenesis using the QuickChangeTM kit (Stratagene, Germany) (Papworth *et al.*, 1996). The following oligonucleotides were used to construct X175bT (mismatch bases underlined): agc tct tgc aaa agt gcc tcc tca ttc ata atc acc agc aac atg ttc (sense) and gaa cat gtt gct ggt gat tat gaa tga gga ggc act ttt gca aga gct (antisense). The X175bT sequence was further introduced into existing cDNA of X99bT, X190bT, X(99/190)bT (Rauh *et al.*, 2002) to yield X(99/175)bT, X(190/175)bT and X(99/190/175)bT variants. The refolding protocol was modified through the use of an injection device to allow stepwise addition of the solubilised inclusion bodies into the refolding buffer at intervals of 30 min over 24 hours, followed by incubation for an additional 24 hours at 4°C. The refolded trypsinogen was activated to trypsin by incubating with bovine enterokinase; activated trypsin was purified and concentrated by FPLC using soybean trypsin inhibitor covalently bound to agarose (Hedstrom *et al.*, 1996).

Measurement of inhibition constants

Inhibition assays of trypsin variants were measured by using Pefachrome-tPa (CH_3SO_2 -D-HHT-Gly-Arg-pNA*AcOH) (Loxo GmbH, Dossenheim, Germany) as substrate in a

solution of 50mM Tris/HCl pH8.0, 154 mM NaCl, 5% ethanol as described (Stürzebecher *et al.*, 1989) with the addition of 10mM CaCl₂. Proteolytic activity was quantified by measuring the rate of hydrolysis of the chromogenic substrate using an IEMS plate reader (Thermo Labsystems, Finland) at 405 nm and 25°C. Each measurement was carried out in triplicate. Inhibition of the enzymes was determined by plotting 1/v against the concentration of the inhibitor according to Dixon (Dixon, 1972).

Crystallisation and data collection

Orthorhombic crystals of recombinant wild-type bovine trypsin and X(99/190)bT suitable for soaking experiments grew within one day after seeding with wild-type 'open' orthorhombic crystals. Crystals were harvested in 2.5 M ammonium sulphate, 0.1 M MES, pH 6, saturated with CaCl₂ and cross linked by adding 0.25% of glutaraldehyde and incubating for 30 minutes. After extensive washing in 30% PEG 8000, 0.1 MES, pH 6.0, the crystal was transferred into the same buffer containing 10 mg/ml of the inhibitor (**1**). After soaking for several hours, the crystal was mounted in a capillary and transferred to the X-ray source. For co-crystallisation, trypsin variant X(99/190/175)bT was preincubated with 10 mg/ml inhibitor in 1 mM HCl, 10 mM CaCl₂ for several hours. Cococrystallisation was carried out at room temperature using vapour diffusion, with a final protein concentration of 5 mg/ml. The trigonal crystals grew in 0.1 M imidazole pH 7, 0.1-0.3 M ammonium sulphate and 20-30% polyethyleneglycol 8000 after a few weeks.

X-ray data were collected in house at room temperature using an R-AxisIV++ image plate system (MSC, Texas) installed on a Rigaku rotating anode generator and evaluated with DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) or CrystalClearTM 1.3 (MSC, Texas). Starting coordinates were taken from reference (Rauh *et al.*, 2002). Conventional crystallographic refinement (rigid body, positional, temperature factor) was carried out using CNS (Brünger *et al.*, 1998). Molecular models of the isomers were constructed using SYBYL (Tripos Associates) and model building performed using O (Jones *et al.*, 1991). Target values for bond length and angle refinement of the inhibitor were taken from the small-molecule structure; weak planarity constraints were applied, while all dihedral angles were left free to rotate. Data collection and refinement statistics are given in **Table 3.2-1**.

Table 3.2-1. Data Collection and Refinement Statistics

	X(99/175/190)bT / (1)	X(99/190)bT / (1)	native bov. trypsin / (1)
space group	P3 ₁ 21	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
cell constants (Å)	55.2 55.2 111.3	63.8 69.3 63.1	63.0 69.5 63.9
observed/ unique reflections	63743/18842 (100 – 1.8 Å)	70592/19118 (100 – 2.0 Å)	188838/31389 (100 – 1.7 Å)
completeness	99.6% (98.8% 1.86 – 1.8 Å)	97.8% (99.8% 2.07 – 2.0 Å)	99.4% (100.0% 1.76 – 1.7 Å)
R _{sym}	5.4% (35.9% 1.86 – 1.8 Å)	7.5% (32.4% 2.07 – 2.0 Å)	6.6% (37.1% 1.76 – 1.7 Å)
Refinement			
number of non hydrogen atoms			
per asymmetric unit			
protein	1632	1633	1629
ions	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺
solvent	124	61	110
inhibitor	28	28	28
rms deviation			
bond	0.005	0.005	0.005
angles	1.350	1.347	1.310
R _{work}	17.3%	18.7%	17.4%
R _{free}	19.6%	21.2%	19.6%

$$R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$$

3.2.4 Results and Discussion

The structure determination of a single crystal of (**1**) reveals the (E,E) configuration of the inhibitor (**Figure 3.2-2, Table 3.2-2**). The extended molecule exhibits C₂ symmetry, with the cycloheptanone ring in a twisted conformation (see **Figure 3.2-4A**). The carbon atoms linking the cycloheptanone ring to the two amidinobenzyl side chains are both planar, with the plane of the carbonyl group halfway between these two planes (**Table 3.2-2**). The positive charges of the amidino functions are compensated by the presence of two chloride ions in the crystal; in addition, two partially disordered water molecules are observed.

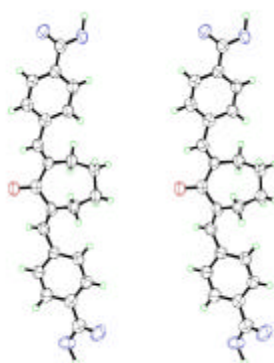



Figure 3.2-2. The small molecule crystal structure of (**1**) as found in the centrosymmetric space group P(-1). The extended inhibitor possesses C₂ point symmetry, with the cycloheptanone ring in a twisted conformation. The double bonds to the benzamidino wings exhibit the (E,E) configuration.

The extended molecule exhibits C_2 symmetry, with the cycloheptanone ring in a twisted conformation. The carbon atoms linking the cycloheptanone ring to the two amidinobenzyl side chains are both planar, with the plane of the carbonyl group halfway between these two planes.

Using the same batch of inhibitor, **(1)** shows clear density for the (Z,Z) configuration in trigonal co-crystals with X(99/175/190)bT (**Figure 3.2-3A**). As for the (E,E) configuration isomer, the (Z,Z) form exhibits C_2 symmetry, with a chair conformation of the seven membered ring and equivalent planar groups (see **Figure 3.2-4B**). This is in contrast to the (E,Z) form previously observed in the same crystal form of native trypsin (Renatus *et al.*, 1998), where the proximal substituent accommodated in the S1 pocket is in the Z-configuration and the distal arm in the E-configuration. In addition to the obvious lack of symmetry between the E- and Z- substituents, the (E,Z)-cycloheptanone ring is in an asymmetric boat conformation (**Figure 3.2-4C**). Furthermore, the planarity for the distal arm extends to the carbonyl group ($\omega_1' \sim 0$), suggesting significant conjugation of the electronic system on the E-configured side.

Table 3.2-2. Torsion angles of **(1)** in three different molecular environments.



	distal		proximal	
	ω_2'	ω_1'	ω_1	ω_2
(E,Z)	-172.0°	7.0°	71.0°	6.4°
(Z,Z)	-8.1°	-30.4°	-33.6°	-7.8°
(E,E)	-178.1°	-12.8°	-12.9°	-178.2°

Despite these differences in structure, the major determinants of binding for (Z,Z) appear to be identical to those for (E,Z) – simultaneous occupation of the S1 pocket and the aromatic box, together with interactions between the distal basic group and an electrophilic cavity formed by the carbonyl groups of residues 97, 99 and 175 (Brandstetter *et al.*, 1996; Stubbs *et al.*, 1995). Comparison of the binding modes of (E,Z) and (Z,Z) show that the proximal and distal benzamidine rings and their amidino functions are virtually superimposable. In each case, the proximal amidino group occupies the primary specificity pocket, while the distal aromatic group stacks over the side chain of Trp215.

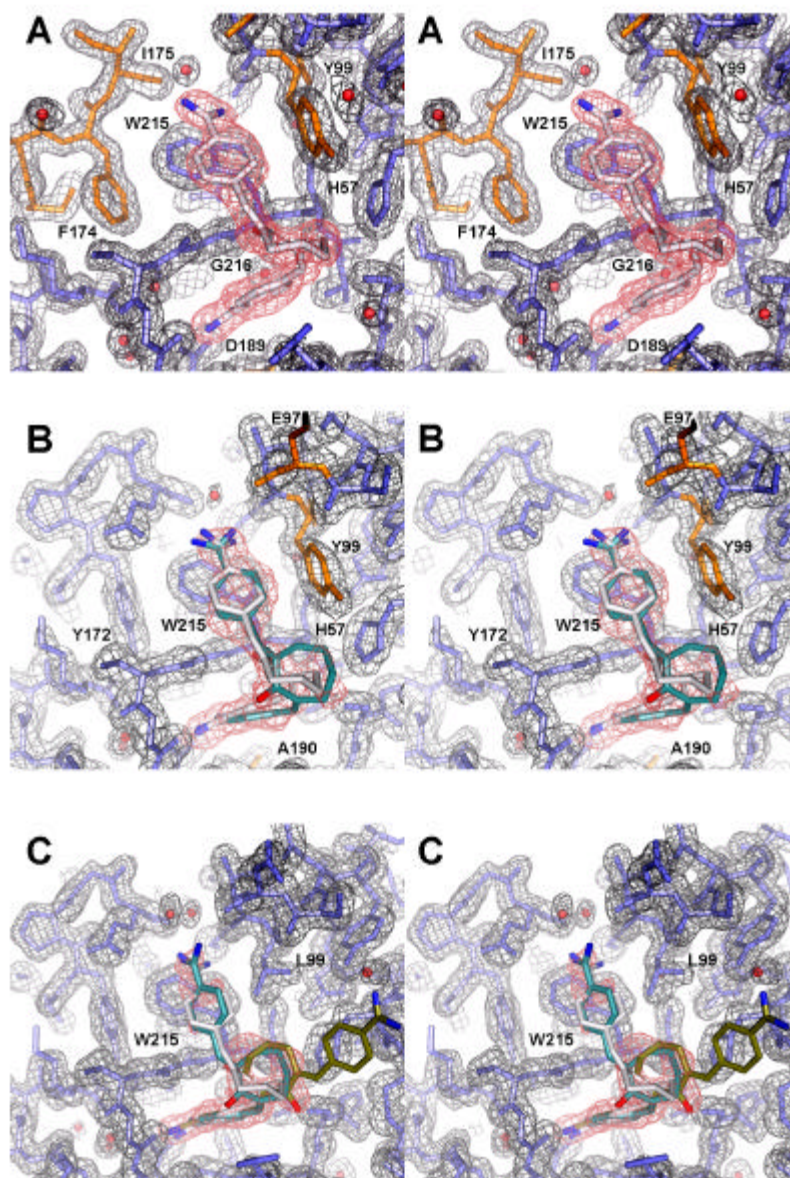


Figure 3.2-3. (A) Experimental electron density for (1) in co-crystals with trypsin variant **X(99/190/175)bT**. The inhibitor exhibits the (Z,Z)-configuration, with C_2 symmetry and a chair conformation of the seven-membered ring. As observed for the (E,Z) binding to trypsin (**Figure 3.2-1A**, (Renatus *et al.*, 1998)), the inhibitor binds in an extended conformation, with the distal benzamidine parallel to Trp215 and perpendicular to Tyr99. Mutated residues are highlighted in orange. (B) Soaking of (1) into open orthorhombic crystals of **X(99/190)bT** (Rauh *et al.*, 2002) reveals simultaneous binding of both (E,Z) and (Z,Z). The proximal benzamidino group is displaced slightly from its position in trypsin due to van der Waals' clashes with the side chain of Tyr99. (C) All three configurations are found in wild type bovine trypsin after soaking inhibitor (1) into open orthorhombic crystals. The distal benzamidino group of the E/E-isomer (olive) reaches out of the binding site towards the solvent whereas the distal benzamidino groups of the E/Z- (light blue) and the Z/Z-isomer (silver) are as found in co-crystals with trypsin (**Figure 3.2-1A**) and **X(99/175/190)bT** (**Figure 3.2-3A**).

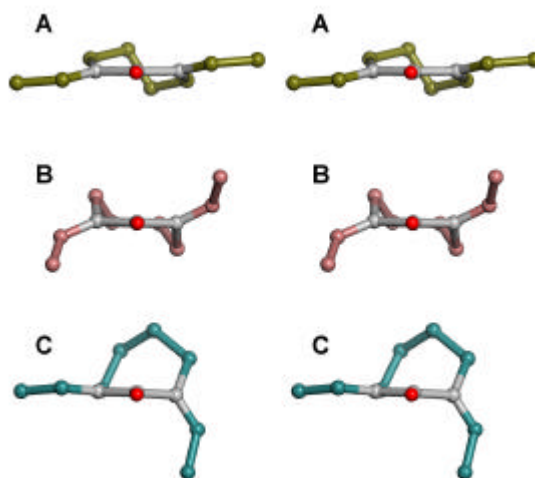


Figure 3.2-4. Conformations of the cycloheptanone ring system viewed along the carbonyl axis. The isomers (E,E) (**A**, twisted) and (Z,Z) (**B**, chair) show a C_2 -symmetry with opposing twists of the ring, whereas isomer (E,Z) (**C**, asymmetric boat) lacks rotational symmetry. The carbonyl carbon C1 as well as C2 and C7 are coloured silver.

Small differences in interaction pattern are seen, however. In the (Z,Z) form, the cycloheptanone ring abuts against the side chain of Tyr99, with its carbonyl group making a weak hydrogen bond (3.3Å) to Gly216N. In the (E,Z)-form, the carbonyl function points away from the enzyme, approximately perpendicular to the direction in (Z,Z). In contrast to the binding in trypsin (Renatus *et al.*, 1998), but as we have observed in X(99/190)bT (Rauh *et al.*, 2002), the distal benzamidine is parallel to Trp215 and perpendicular to Tyr99. The positively charged amidino function appears to make cation- π interactions to the aromatic ring system of Trp215.

Based on the present (Z,Z)-complex, it becomes clear that the experimental electron densities obtained upon soaking (**1**) into the ‘open’ orthorhombic form are a superposition of multiple configuration isomers (**Figure 3.2-3**). In X(99/190)bT (Rauh *et al.*, 2002), both configurations are clearly present (**Figure 3.2-3B**), although the (E,Z) configuration dominates. A similar density was also observed for (**1**) in complex with human tPA, which also contains residue Tyr99 (Renatus *et al.*, 1997). The (E,Z) binding in X(99/190)bT shows a slight displacement from its position in trypsin, due to steric hindrance between Tyr99 and the central heptanone ring. Soaking (**1**) into crystals of wild type trypsin reveals a superposition of all three forms, (E,E), (E,Z), (Z,Z) (**Figure 3.2-4C**). The weaker binding of the extended (E,E) configuration isomer is presumably a result of the lack of contacts to any protein portions outside the S1-pocket.

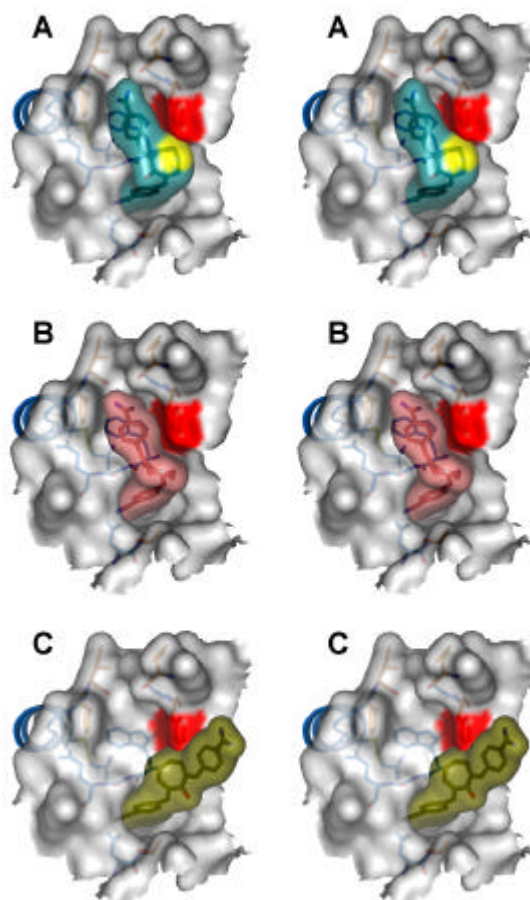
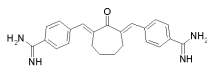

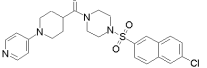


Figure 3.2-5. Binding modes of the three isomers transferred to the active site of factor Xa, together with solvent accessible surfaces. **(A)** The cycloheptanone-ring system of the (E/Z)-isomer (light blue) clashes (yellow) with the side chain of Tyr99 (red). **(B)** The (Z,Z)-configuration fits optimally to the binding site of factor Xa. **(C)** The (E,E) isomer makes no favourable interactions outside of the primary specificity pocket.

As the overall binding modes of (E,Z) and (Z,Z) are so similar, it is understandable that they should each bind trypsin with similar affinity. In the presence of Tyr99, however, the steric hindrance afforded by the cycloheptanone ring in the (E,Z) configuration will result in a reduction of affinity in factor Xa (**Figure 3.2-5**). For (Z,Z) on the other hand, this ring provides additional favourable interactions through van der Waal's contacts to Tyr99. The combination of these effects would therefore yield differential binding energies of (Z,Z) and (E,Z) for factor Xa. The reported high affinity of **(1)** can be explained from the almost perfect shape complementarity of the ligand in (Z,Z) configuration and the binding site of factor Xa.

Analysis of the inhibitory data for the variants fails to show any major change in affinity for **(1)** (**Table 3.2-3**), in stark contrast to the progressive increase in affinity observed in the corresponding rat trypsin variants upon stepwise introduction of the factor Xa binding site (Reyda *et al.*, 2003). Similarly, rat variants showed intermediate behaviour towards benzamidine **(2)**, which is not the case for the bovine mutants. On the other hand, the chloronaphthyl-based inhibitor **(3)** (**Table 3.2-3**) shows a 5-fold enhancement in affinity for both X99rT and X99bT, and no further improvement for the triple X(99/175/190)T variants. What might be the reasons for this large discrepancy in results for two seemingly similar mutants, and for the poor affinity of the triple variants?

Table 3.2-3. Kinetic values for variants and inhibitors: **(1)**: 2,7-bis(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one; **(2)**: benzamidine; **(3)**: [4-(6-Chloro-naphthalene-2-sulfonyl)-piperazin-1-yl]-([3,4,5,6-tetrahydro-2H-1,4']bipyridinyl-4-yl)-methanone

Ki-values [μM]			
	(1)	(2)	(3)
bovine trypsin	0.40	39	13.4
X99bT ^a	0.70	36	2.31
X190bT ^b	0.30	34	8.03
X(99/190)bT ^{a,b}	0.90	53	0.85
X175bT ^c	0.48	79	15.2
X(99/175)bT ^{a,c}	1.40	79	2.45
X(175/190)bT ^{b,c}	0.91	81	8.15
X(99/175/190)bT ^{a,b,c}	1.25	69	1.95
rat trypsin	0.122	6.50	26
X99rt ^d	0.054	32	4.45
X(99/175/190)rt ^{b,d,e}	0.025	143	6.05
factor Xa	0.025	160	0.016

^a Contains the mutation (Asn97, Leu99) \rightarrow (Glu97, Tyr99)

^b Contains the mutation (Ser190) \rightarrow (Ala190)

^c Contains the mutation (Tyr172, Pro173, Gly174, Gln175) \rightarrow (Ser172, Ser173, Phe174, Ile175)

^d Contains the mutation (Lys97, Leu99) \rightarrow (Glu97, Tyr99)

^e Contains the mutation (Tyr172, Pro173, Gly174, Lys175) \rightarrow (Ser172, Ser173, Phe174, Ile175)

Our results suggest that optimal binding of **(1)** requires the presence of the aromatic box. One possible explanation for the difference in the affinity of **(1)** between X99rT and X99bT may be the presence of the aromatic side chain of Tyr217 (Ser217 in bovine trypsin) (Reyda *et al.*, 2003). In the X99rT variant, binding of **(3)** results in complementation of the aromatic box through flipping of this side chain. The inability to form this favourable interaction could therefore result in weaker binding to X99bT.

Although variant X(99/175/190)bT contains all residues necessary for construction of the factor Xa binding site, the aromatic box is not formed in this variant due to the burial of the side chain of Phe174 (the ‘down’ conformation). This is accompanied by a reorientation of the intermediate helix, as we have recently observed for the rat trypsin variant X(99/175/190)rT (Reyda *et al.*, 2003). In X(99/175/190)rT, this region appears to be in dynamic equilibrium between the ‘up’ and ‘down’ forms: the variant could be transformed into the ‘up’ conformation through binding of **(3)** (Reyda *et al.*, 2003). In X(.../175/...)bT, however, we observe only one single conformation – despite the binding of various inhibitors and a variety of different crystal forms (and hence packing environments; manuscript in preparation). We therefore conclude that this region is less malleable in bovine trypsin variants compared to rat trypsin mutants.

3.2.5 Conclusions

The present study highlights some of the challenges facing the development of structure based drug design. The crystal structure of a protein – ligand complex is generally accepted as the ‘gold standard’ – yet here we see an influence of crystallisation technique on the observed binding mode(s). Soaking of **(1)** into trypsin crystals results in a superposition of three different configuration isomers, despite the low affinity of the (E,E)-form for trypsin. In contrast, co-crystallisation selects for the ‘best binder’, leading to a single binding mode as observed for (E,Z) in trypsin (Renatus *et al.*, 1998) or (Z,Z) in X(99/175/190)bT. This could be a result of the short time (a few hours) in which the inhibitors were diffused into the crystals exposed to soaking, compared to the several weeks necessary for the growth of co-crystals. As homogenous protein-ligand complex is necessary for crystal growth, the process of crystallisation will shift the relative populations of complexes towards those of highest affinity, leading to an enrichment of one single binding mode observed in the co-crystal structure.

In addition, changes in solution conditions might play a role in relative affinity of different compounds: the various crystal forms appear at distinct pH, salt and buffer concentrations, in turn different to the conditions prevalent in the enzymatic assay. Such variations can have profound effects upon charged interactions, borne out in our recent study of the interaction of **(3)** with bovine trypsin (Stubbs *et al.*, 2002), which revealed a pH dependent binding mode.

Our experience with protein-ligand complex structures suggests that multiple binding modes are by no means uncommon (Renatus *et al.*, 1998; Stubbs *et al.*, 1995; Stubbs *et al.*, 2002) (unpublished results). As we see here, this can be a particular problem in soaking experiments – failure to detect such effects may result in misleading interpretations, in particular concerning solvent structure. This must be weighed against the practicality and economy of soaking experiments; in this respect, the recent application of crystallographic screening for drug discovery (Carr & Jhoti, 2002; Nienaber *et al.*, 2000b) holds great promise.

In addition to the questions raised here, further phenomena that are still poorly understood include the influence of flexibility and dynamics, solvation and desolvation, crystallisation conditions and packing forces upon both the binding mode and binding affinity. There remains a wide gap in our knowledge about the experimentally determined structures and the thermodynamics of protein – ligand complex formation (Dullweber *et al.*, 2001; Gohlke & Klebe, 2002). The robust experimental model system described here allows dissection and analysis of the many competing processes involved, paving the way for a better understanding of the theoretical methods necessary for effective drug design.

3.2.6 Acknowledgements

The authors would like to thank Maren Möller for help with crystallisation and Christian Sohn for expert technical assistance. Compound **(1)** was kindly provided by Pentapharm Ltd., Basel, Switzerland. Financial support was provided by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Graduiertenkolleg “Proteinfunktion auf atomarer Ebene”.

3.3 Understanding protein-ligand interactions: Role of protein plasticity¹⁵

3.3.1 Abstract

In order to design selective high affinity ligands to a target protein, it is necessary to understand the structural determinants for protein – ligand complex formation. Previous experiments to introduce the factor Xa ligand binding site into trypsin resulted in variants that exhibited conformational variability with reduced affinity for factor Xa selective inhibitors. In the present study, the effects of specific mutations designed to stabilise / destabilise individual conformations are characterised both structurally and kinetically using a variety of inhibitors. In general, conformational variability results in a reduction in ligand affinity. This reduction can be partially or wholly offset by compensatory binding to a particular conformation. The insights provided by these studies will be helpful in improving our understanding of ligand binding for the drug design process.

Keywords

Crystal structure/ inhibitor/ Factor Xa/ selectivity / flexibility / drug design

¹⁵ Daniel Rauh, Gerhard Klebe & Milton T. Stubbs, eingereicht

3.3.2 Introduction

Modern pharmaceutical research aims to develop safe and innovative drugs that bind selectively to a particular target protein. Selective binding ensures a unique pharmacological response, and helps reduce undesirable side effects. Yet many potential drug targets belong to superfamilies of structurally and functionally related proteins with similar ligand binding sites. The distribution or compartmentalisation of related proteins into various organs, tissues and cellular locations within the organism means that proteins with similar actions can elicit widely varying physiological responses. For the drug designer, however, the need to apply xenobiotic drugs systemically mean that the small structural variations between individual binding sites must be exploited in order to achieve selectivity. A prerequisite for such specific addressing is a detailed understanding of the determinants responsible for nuances in affinity to a receptor binding site. Recent advances in biotechnology and structural biology mean that information concerning the binding site of a potential target is increasingly available in the initial stages of a drug design project. The combination of this information with a detailed understanding of the rules governing the ligand binding process offer the possibility of speeding up the drug discovery processes.

An implicit assumption for computational approaches to drug design is that the affinity (and thereby selectivity) of a ligand comes from direct contacts to amino acid residues of the receptor binding site. In order to test the validity of this assumption, we have introduced the binding site of factor Xa into the related enzyme trypsin via site directed mutagenesis. Based upon the known structure of factor Xa (Brandstetter *et al.*, 1996; Kamata *et al.*, 1998; Maignan *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2002; Padmanabhan *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 2002; Sperl *et al.*, 2000a), three regions were selected for insertion into rat (Reyda *et al.*, 2003) and bovine (Rauh *et al.*, 2003; Rauh *et al.*, 2002) trypsins: the '99-loop', the '190-loop' and the '175-loop' (**Figure 3.3-1a**). As an initial scaffold, rat trypsin was mutated to yield two variants with the 99-loop and with the complete binding site of factor Xa (Reyda *et al.*, 2003). Structural investigation of the latter **X(triple)rT** variant (previously termed X(99/175/190)rT, see **Table 3.3-1**) displayed large scale structural rearrangements with respect to both trypsin and factor Xa (**Figure 3.3-1b**). The side chain of Phe174 was buried in the hydrophobic core of the enzyme (the 'down' conformation) bounded by residues Ile176, Trp215, Pro225, Val227 and the disulphide

Cys168-Cys182, and the 'intermediate helix' was reoriented and partially unwound (**Figure 3.3-1c**). Introduction of the factor Xa specific inhibitor (**2**) into **X(triple)rT** crystals induced a substantial reorganisation of the binding site, namely surface exposure of Phe174 and adjustment of the helix to form the factor Xa-like 'up'-conformation (**Figure 3.3-1c**).

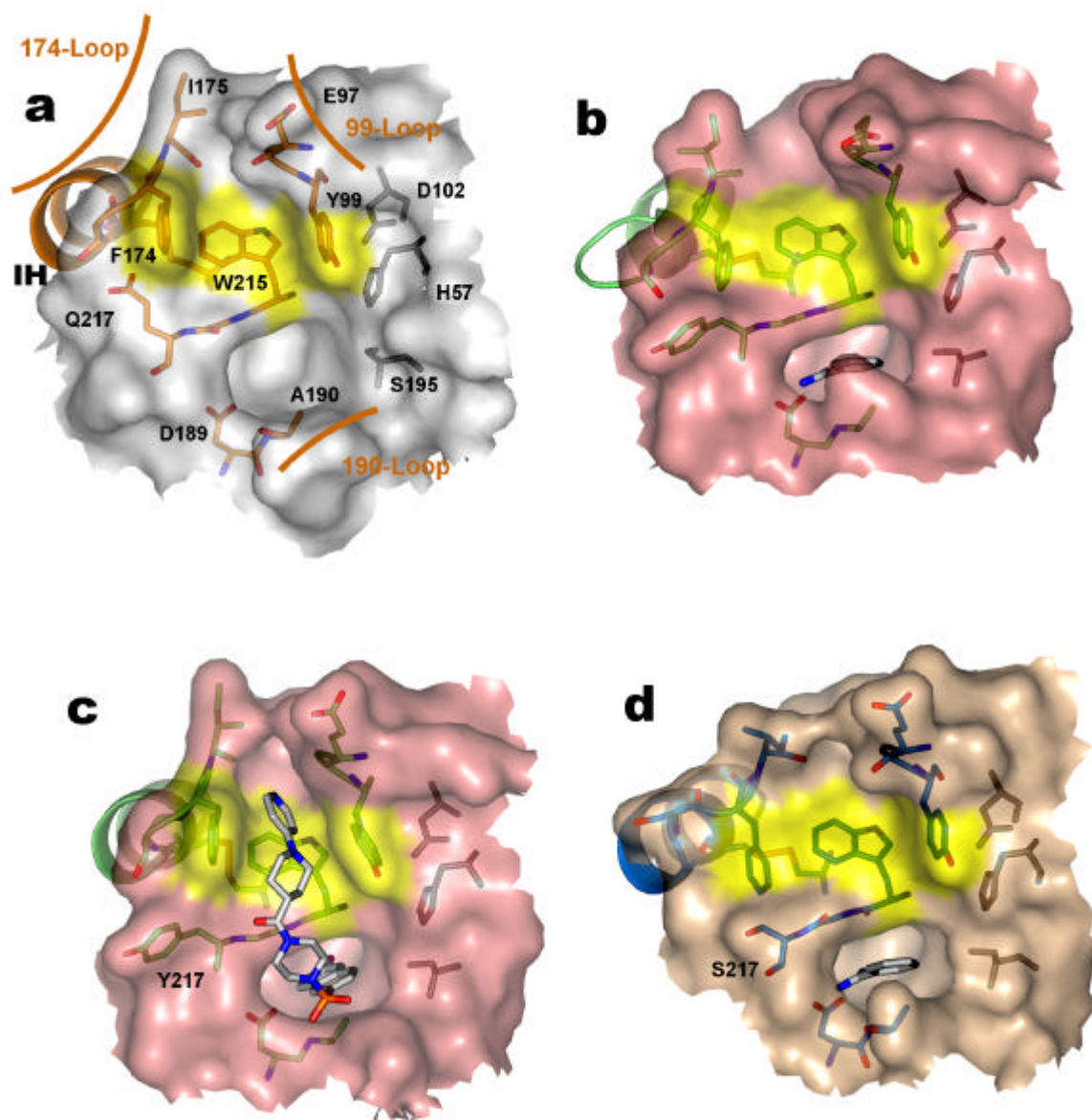


Figure 3.3-1. Surface representations of the binding sites of (a) factor Xa, (b) **X(triple)rT** in complex with inhibitor (**1**), (c) **X(triple)rT** in complex with inhibitor (**2**) and (d) **X(triple)bT** in complex with inhibitor (**1**) (c). Note the differences in orientation of the helix, the conformation of cystine Cys168-Cys182 and the degree of exposure of Phe174: (a) and (c) exhibit the 'up'-conformation, whereas (b) and (d) possess the 'down'-conformation.

Although this pilot study demonstrated that the grafted loops were capable of adopting the desired target structure, the affinity of **(2)** for **X(triple)rT** was some 300-fold less than that for factor Xa; presumably, the structural transition absorbs part of the binding energy. This led us to use bovine trypsin, for which a large amount of kinetic and structural data are available, as well as an established crystal soaking system for ligands (Rauh *et al.*, 2003; Rauh *et al.*, 2002). These variants have yielded insights into the structural determinants for ligand affinity and selectivity.

Nevertheless, bovine trypsin variants incorporating the 175-loop failed to show the expected increase in affinity for factor Xa inhibitors (Rauh *et al.*, 2003) (**Table 3.3-1**). We postulated that this may be due to a predominance of the ‘down’-conformation in these variants **Figure 3.3-1d**. Although the rat trypsin variant **X(triple)rT** (Reyda *et al.*, 2003) also exhibited a ‘down’-conformation, the crystallographic data revealed that exchange is possible between the ‘up’ and ‘down’ conformations of the 175-loop in **X(triple)rT**. In contrast, the bovine variants appear to possess only the ‘down’-conformation, despite the availability of multiple crystal forms and different inhibitors (Rauh *et al.*, 2003). Could it be that the ‘down’-conformation of the Ser172-Ser173-Phe174-Ile175 (**SSFI**) sequence is energetically favoured and thus more stable in bovine trypsin than in corresponding rat trypsin variants?

The contrasting kinetic and structural behaviour of **X(triple)bT**, **X(triple)rT** and factor Xa towards a variety of ligands prompted us to design and characterise further bovine trypsin variants that might influence the stability of loop region 175 and thereby interactions with ligands. In this paper, we describe the kinetic and structural characterisation of six variants in which residues 174 (Phe in factor Xa) and 217 (Ser in trypsin, Glu in factor Xa) are studied with respect to four distinct inhibitors (**Table 3.3-1**). Single amino acid substitutions at position 174 were aimed at disfavouring the burial of the aromatic side chain, while Glu217 was introduced to test a possible stabilising influence in factor Xa.

3.3.3 Results

Design of the variants

In all previous bovine trypsin variants containing the factor Xa sequence Ser172-Ser173-Phe174-Ile175 (**Table 3.3-1**) (Rauh *et al.*, 2003), the ‘down’-conformation of the intermediate helix was accompanied by the burial of the Phe174 side chain in an hydrophobic pocket (**Figure 3.3-1d**). Four variants based on **X(SSFI)bT** were constructed to explore the cause and effect of this burial: **(1) X(SSYI)bT**, with a less hydrophobic side chain that could favour the solvent exposed ‘up’-conformation; **(2) X(SSWI)bT**, whose bulky side chain should be too large to occupy the hydrophobic cavity and could thus hinder the ‘down’-conformation; **(3) X(SSAI)bT**, whose lack of an aromatic moiety should make it less amenable to the ‘down’ position, and **(4) X(SSRI)bT**, whose hydrophilic side chain should resist burial and therefore adopt the ‘up’-conformation.


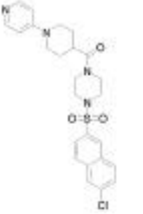
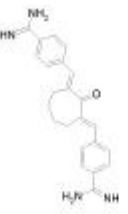
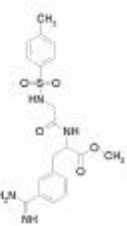
Further possible stabilising interactions for the ‘up’-conformation were also sought. In factor Xa, the side chain of Glu217 forms a hydrogen bond to the side chain of Ser173 in the 175-loop. To investigate whether this residue is capable of influencing the ‘up’-conformation, two additional mutants were constructed: **X(SSFI.Glu)bT** and **X(triple.Glu)bT**, containing the entire binding site of factor Xa together with Glu217.

Production of the variants and kinetic analysis

Bovine trypsin variants **X(SSYI)bT**, **X(SSWI)bT**, **X(SSAI)bT**, **X(SSRI)bT**, **X(SSFI.Glu)bT** and **X(triple.Glu)bT** were cloned and expressed as inclusion bodies in *E. coli*. All variants could be refolded, and showed catalytic activity towards the chromogenic substrate Pefachrome-tPA after activation by bovine enterokinase. Four compounds were chosen to compare the inhibition of the variants, selected for their differential inhibition of factor Xa and trypsin (**Table 3.3-1**) (Rauh *et al.*, 2003; Rauh *et al.*, 2002; Renatus *et al.*, 1998; Reyda *et al.*, 2003; Stubbs *et al.*, 2002). Kinetic characterisation of the **X(SSYI)bT** variant revealed no difference in inhibition by compounds (1-4) compared to **X(SSFI)bT** (**Table 3.3-1**). In contrast, **X(SSWI)bT** showed a reduction in affinity for two of the benzamidine-based inhibitors **(1)** and **(4)**, whilst showing comparable inhibition by **(2)** and **(3)**. **X(SSAI)bT** was inhibited by **(1)**, **(3)** and **(4)** in a similar fashion to **X(SSWI)bT**, but showed a marked decrease in affinity for the chloronaphthyl containing **(2)**. A dramatic decrease was noted for all inhibitors with

respect to **X(SSRI)bT**. All in all, the variants **X(SSXI)bT** at position 174 all showed similar or reduced affinity compared to **X(SSFI)bT**, with the most pronounced differences relating to the factor Xa selective inhibitor **(2)**. In contrast, introduction of Glu217 in **X(SSFI.Glu)bT** resulted in a significant increase in affinity for inhibitors **(2)** and **(3)**, the latter approaching closely that of factor Xa. The most dramatic change in affinity was observed for variant **X(triple.Glu)bT** with a 3 fold increase for **(2)** and a 25 fold increase for **(3)** with respect to the **X(triple)bT** variant.

Table 3.3-1. Inhibition data for the variants. Inhibitors used in this study: **(1)**: benzamidine (unspecific, weak inhibition of both trypsin and factor Xa, better for trypsin); **(2)**: [4-(6-Chloronaphthalene-2-sulfonyl)-piperazin-1-yl]-([3,4,5,6-tetrahydro-2H-1,4'-bipyridinyl-4-yl)-methanone (specific for factor Xa); **(3)**: 2,7-bis(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one (unspecific, strong inhibition of both enzymes, marginally better for factor Xa); **(4)** N^α -tosylglycyl-3-amidino-D,L-phenylalanine-methylester (unspecific, weak inhibition of both enzymes, marginally better for factor Xa).

Ki-values [μ M]				
	(1)	(2)	(3)	(4)
bovine trypsin	39	13.40	0.40	4.37
X(99)bT ^a	36	2.30	0.70	7.15
X(190)bT ^b	34	8.03	0.30	7.60
X(190/99)bT ^{a,b}	53	0.85	0.90	12.00
X(SSFI)bT ^c	79	15.19	0.48	21.04
X(99/174)bT ^{a,c}	79	2.45	1.40	21.40
X(190/174)bT ^{b,c}	81	8.15	0.91	15.10
X(99/190/174)bT ^{a,b,c}	69	1.95	1.25	22.10
rat trypsin	7	26.00	0.12	
X(99)rt ^d	32	4.45	0.054	
X(triple)rt ^{b,d,e}	143	6.05	0.025	
X(SSYI)bT	55	19.44	0.34	18.45
X(SSWI)bT	306	11.96	0.57	73.62
X(SSAI)bT	427	97.12	0.92	97.79
X(SSRI)bT	566	> 1000	21.98	278.96
X(SSFI.Glu)bT	68	4.57	0.057	19.56
X(triple.Glu)bT	51	0.65	0.049	31.55
factor Xa	160	0.02	0.025	0.84

^a Contains the mutation (Asp97, Leu99) \rightarrow (Glu97, Tyr99)

^b Contains the mutation (Ser190) \rightarrow (Ala190)

^c Contains the mutation (Tyr172, Pro173, Gly174, Gln175) \rightarrow (Ser172, Ser173, Phe174, Ile175)

^d Contains the mutation (Lys97, Leu99) \rightarrow (Glu97, Tyr99)

^e Contains the mutation (Tyr172, Pro173, Gly174, Lys175) \rightarrow (Ser172, Ser173, Phe174, Ile175)

Crystallisation of the variants

Co-crystallisation experiments of each variant were carried out at room temperature in the presence of inhibitors **(1)**, **(2)**, **(3)** and **(4)** at pH7-8 using PEG8000 and ammonium sulphate (**Table 3.3-2**). Crystals were obtained with inhibitors **(1)** and **(4)** in both the trigonal P3₁21 **(A)** and orthorhombic ‘closed’ **(B)** modifications commonly found for bovine trypsin (Renatus *et al.*, 1998; Stubbs *et al.*, 2002), while no co-crystals were obtained with **(2)** or **(3)**. Using ammonium sulphate as precipitant at pH6, seeding experiments with wild type trypsin orthorhombic ‘open’ **(C)** crystals in the presence of **(1)** resulted in a new trigonal space group P3₂21 **(D)** in addition to orthorhombic **(B)** and **(C)** crystal forms. For variant **X(triple.Glu)bT**, crystal form D was obtained after seeding with orthorhombic C native crystals at 40°C in the presence of **(1)**.

Table 3.3-2. Crystallisation conditions and data collection statistics.

structure ^a	crystallisation conditions ^b	ligand ^d	crystal form	space group	cell constants			observed/unique reflections	R_{int} ^e
					$a(\text{\AA})$	$b(\text{\AA})$	$c(\text{\AA})$		
X(SSYD)bT.A4	30% PEG 8000; 0.2 AS; pH 8	(4)	A	P3 ₁ 21	55.08	55.08	109.75	79456/28453	12.7% (100-1.92Å) 34.7% at 1.99Å
X(SSYD)bT.B4	20% PEG 8000; 0.1 AS; pH 8	(4)	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.11	58.02	68.52	42917/14683	6.1% (100-1.62Å) 28.4% at 1.68Å
X(SSAD)bT.B4	30% PEG 8000; 0.2 AS; pH 7	(4)	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.01	58.21	68.04	79495/21189	14.0% (100-1.78Å) 48.8% at 1.81Å
X(SSAD)bT.C1	1.9 AS; pH 6; seed ^c	(1)	C	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	61.63	70.58	64.13	67639/26162	8.7% (100-1.80Å) 37.6% at 1.86Å
X(SSAD)bT.D1	1.9 AS; pH 6; seed ^d	(1)	D	P3 ₂ 21	54.55	54.55	136.80	84839/22478	11.6% (100-1.80Å) 37.2% at 1.86Å
X(SSWI)bT.B4	20% PEG 8000; 0.3 AS; pH 7	(4)	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.05	55.97	68.53	22345/9738	13.1% (100-2.50Å) 28.6% at 2.38Å
X(SSRD)bT.C1	1.9 AS; pH 6; seed ^c	(1)	C	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	61.10	70.34	64.15	72970/26040	11.8% (100-1.80Å) 45.0% at 1.86Å
X(SSRD)bT.B4	30% PEG 8000; 0.2 AS; pH 7	(4)	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.10	57.78	67.46	125270/22724	8.9% (100-1.70Å) 39.3% at 1.76Å
X(SSFLGlu)bT.B4	20% PEG 8000; 0.3 AS; pH 7	(4)	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.13	58.24	67.81	63385/17873	16.4% (100-1.90Å) 48.1% at 1.97Å
X(SSFLGlu)bT.D1	1.9 AS; pH 6; seed ^d	(1)	D	P3 ₂ 21	54.58	54.58	136.62	88008/25656	9.9% (100-1.72Å) 40.5% at 1.78Å
X(triple.Glu)bT.A1	20% PEG 8000; 0.2 AS; pH 8	(1)	A	P3 ₁ 21	54.93	54.93	108.41	63038/40482	8.0% (100-1.65Å) 41.7% at 1.77Å
X(triple.Glu)bT.D1	1.9 AS; pH 6; seed ^d ; 40°C	(1)	D	P3 ₂ 21	54.68	54.68	136.46	79180/31555	7.5% (100-1.60Å) 27.3% at 1.66Å
X(triple.Glu)bT.D2	1.9 AS; pH 6; seed ^d ; 40°C	(2)	D	P3 ₂ 21	54.75	54.75	144.07	51610/16564	9.2% (100-2.00Å) 31.5% at 2.07Å

^a Structures are distinguished as follows: [variant].[crystal form][inhibitor]; variants and inhibitors are given in **Table 3.3-1**.

^b All crystals were obtained at room temperature unless otherwise stated

^c Crystals obtained after seeding with native crystals, modification (C)

^d See **Table 3.3-1**

$$R_{int} = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$$

Crystal structures of X(SSXI)bT variants

Co-crystallisation of variant **X(SSYI)bT** with inhibitor **(4)** resulted in both trigonal **X(SSYI)bT.A4** and orthorhombic **X(SSYI)bT.B4** crystals (see **Table 3.3-2** for nomenclature). The 175-loop of the **X(SSYI)bT** variant is found in both cases in the 'down'-conformation as previously observed for rat- (Reyda *et al.*, 2003) and bovine-trypsin (Rauh *et al.*, 2003) variants, with the aromatic ring of Tyr174 superposing that of Phe174 in the X(SSFI)bT variants. In both crystal forms, the inhibitor **(4)** binds with its benzamidino moiety in the primary specificity pocket to make a salt bridge to Asp189, together with hydrogen bonds to Gly219O (3Å) and Ser190O^γ (2.7Å) and two water molecules. The remainder of the molecule exhibits an extended conformation (**Figure 3.3-2**), but with different binding modes in each crystal form, as described for bovine trypsin (Renatus *et al.*, 1998). In **X(SSYI)bT.A4**, the tosyl group of **(4)** occupies the S3/S4 site, with hydrogen bonds from the glycine spacer carbonyl oxygen of the inhibitor to Gly216N (2.9Å) and from the sulphonamide nitrogen to Gly216O (2.9Å). In **X(SSYI)bT.B4**, the glycine spacer hydrogen bonds to Gly219N (2.8Å) and the sulphonamide hydrogen bonds to Gly216O (3.0 Å). The tosyl moiety does not address the S3/S4 site; instead, it occupies a hydrophobic cavity of a symmetry-related molecule, bounded by residues Lys159#, Cys136#, Leu137#, Val200# and Gly203#. Residual electron density in **X(SSYI)bT.B4** indicates a second conformation similar to that observed in **X(SSYI)bT.A4**.

Co-crystallisation experiments with variant **X(SSWI)bT** and **(4)** resulted in orthorhombic crystals **X(SSWI)bT.B4**. The inhibitor binds as described for **X(SSYI)bT.B4**, with the tosyl group involved in crystal contacts; in contrast to **X(SSYI)bT.B4**, only one binding mode is observed. Although the intermediate helix and the 175-loop of **X(SSWI)bT.B4** are also in the 'down'-conformation, the backbone atoms of residues 172-175 shift by ~1 Å towards the solvent to accommodate the burial of the larger indole ring of Trp174 (**Figure 3.3-3**).

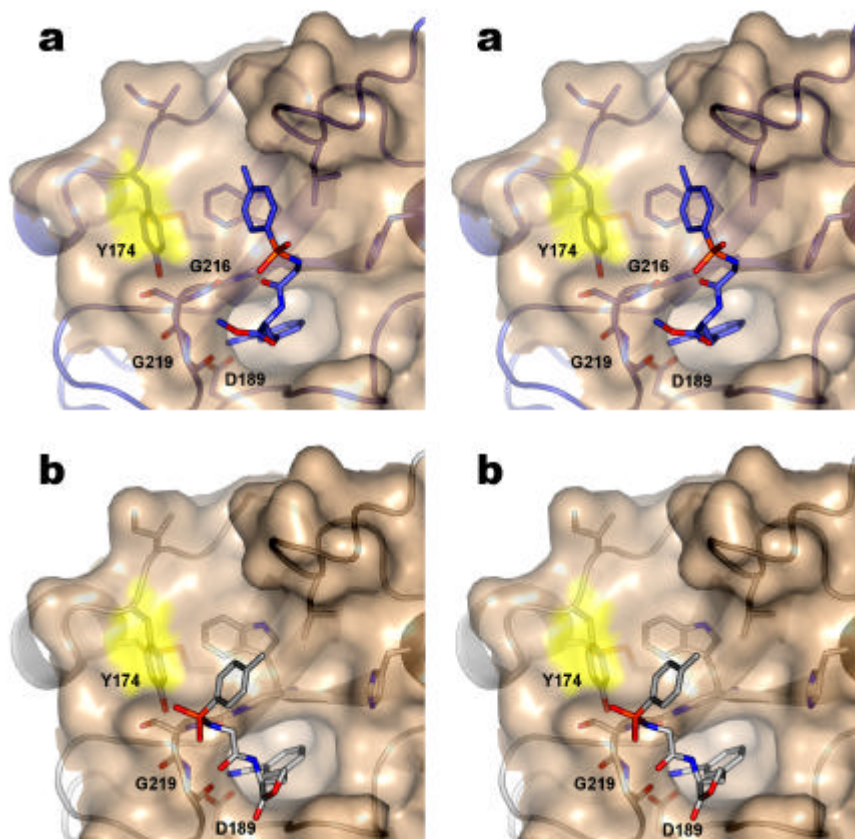


Figure 3.3-2. Alternative binding modes of inhibitor **(4)** in the two structures **(a) X(SSYI)bT.A4** and **(b) X(SSYI)bT.B4** **(b)**. Note in **(a)**, the glycine spacer hydrogen bonds to Gly216; the tosyl group of the inhibitor occupies the S3/S4 site. In **(b)**, the glycine spacer hydrogen bonds to Gly219; the tosyl group points away from the enzyme, making contacts with a symmetry related molecule in the crystal (not shown).

Crystallisation of variant **X(SSAI)bT** resulted in three different crystal forms in the presence of inhibitors **(1)** and **(4)** (**Table 3.3-2**). Co-crystallisation with **(4)** led to orthorhombic crystals **X(SSAI)bT.B4**, with the 175-loop in the ‘down’-conformation (**Figure 3.3-4a**). Density is weak for Ser173, and residues of the intermediate helix are displaced away from the body of the enzyme by ca. 1 Å with respect to their positions in **X(SSFI)bT**. A large cavity is created adjacent to Trp215, occupied in **X(SSFI)bT** by the aromatic side chain of Phe174; no ordered solvent molecules are observed. The inhibitor binds in the same fashion as described for **X(SSWI)bT.B4** and **X(SSYI)bT.B4**, both in the same crystal form. As in the latter structure, extra density indicates that the conformation of **(4)** observed in **X(SSYI)bT.A4** is also partially present.

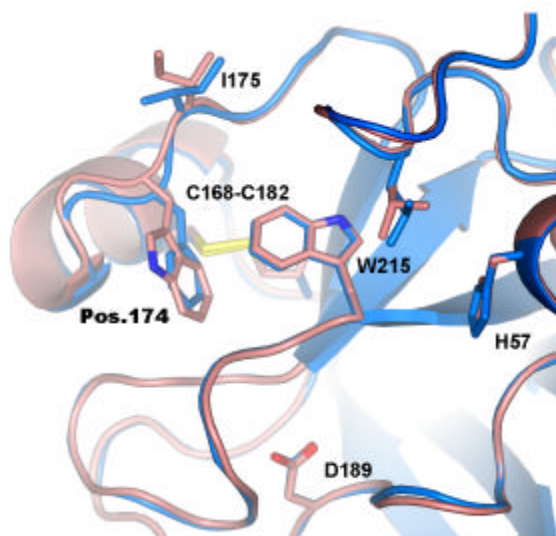


Figure 3.3-3. Superposition of **X(SSFI)bT.B4** (blue) and **X(SSWI)bT.B4** (pink). For simplicity, the inhibitors **(4)** are not shown. The six-membered ring in Trp174 aligns with that of Phe174. Note the shift of the backbone by ca. 1 Å at position 174.

Seeding using wild type **C** crystals in the presence of **(1)** resulted in both the orthorhombic crystal form **X(SSAI)bT.C1** and the new trigonal form **X(SSAI)bT.D1**. In both cases, benzamidine **(1)** is bound in the primary specificity pocket to make a salt bridge to Asp189. In **X(SSAI)bT.C1**, the 175-loop is found in the ‘up’-conformation (**Figure 3.3-4b**). As in **X(SSAI)bT.B4**, residues 172 – 174 are defined by only weak density. The empty cavity observed in **X(SSAI)bT.B4** is still present, but reduced in volume.

In the new crystal modification **D** (**X(SSAI)bT.D1**), the 175-loop is in neither the ‘up’- nor the ‘down’-conformation (**Figure 3.3-4c**), a conformation we refer to as ‘super-up’. The intermediate helix consists of only a single turn from residues 166-169, which is translated half a pitch in the direction of the helix axis compared to factor Xa and trypsin (‘up’-conformation). The side chain hydroxyl of Ser172 is within hydrogen bonding distance of the main chain N and O groups of Ala174. The ‘super-up’ conformation is accompanied by a new arrangement of the Cys168-Cys182 disulphide bond (**Figure 3.3-4d**; **Table 3.3-3**), although we observe additional electron density at the disulphide corresponding to that seen in the ‘up’-structure. As a result of these movements, an even larger cavity is formed, flanked by the side chains of Trp215, Pro225, Val227, Ile176 and cystine Cys168-Cys182. Although no solvent molecules are discernable within the cavity, the entrance is occupied by a single water molecule hydrogen bonded to Ser173N.

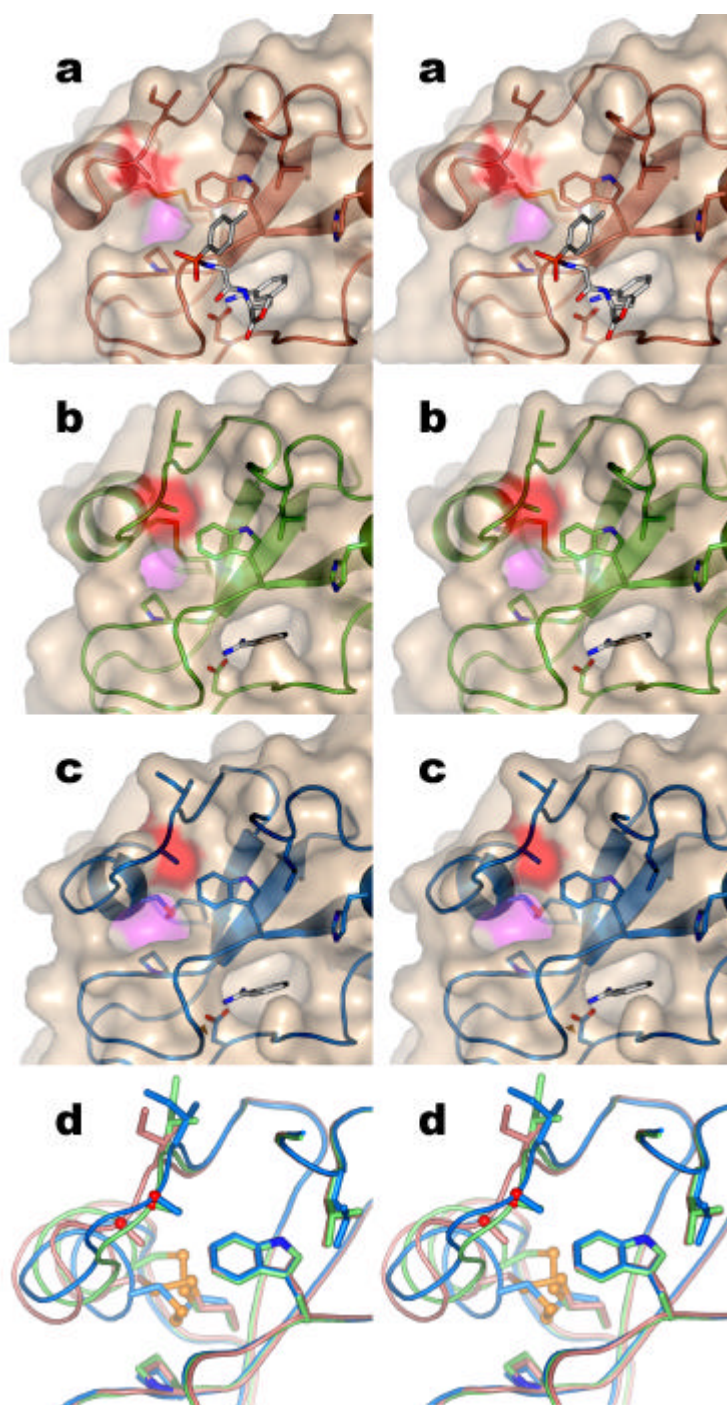


Figure 3.3-4. Ribbon representation of variant **X(SSAI)bT** showing the three different conformations observed. The Ala174 side chain is highlighted in red; note the large cavity (violet) bounded by Pro225, cystine Cys168-Cys182 and Trp215, and the different extents and orientations of the intermediate helix. **(a)** the ‘down’-conformation seen in **X(SSAI)bT.B4**; **(b)** the ‘up’-conformation seen in **X(SSAI)bT.C1**; **(c)** the ‘super-up’-conformation in **X(SSAI)bT.D1**; **(d)** overlay of the three structures: **X(SSAI)bT.B4** (pink); **X(SSAI)bT.C1** (green) and **X(SSAI)bT.D1** (blue); note the different conformations of cystine Cys168-Cys182 (orange) that correlate with the helix orientation. For the sake of simplicity, secondary structure elements are not shown.

Table 3.3-3. Dihedral angles of disulphide Cys168-Cys182 for trypsin variants found in the structures presented here.

structure	space group	χ_1	χ_2	χ_3	χ_2'	χ_1'	distance Å $C_{\alpha} - C_{\alpha'}$
X(SSYI)bT.A4	A	-172,6	175,7	-86,3	178,2	-44,4	6,5
X(SSYI)bT.B4	B	-169,4	176,6	-84,6	-175,8	-49,9	6,5
X(SSAI)bT.B4	B	-165,0	175,4	-86,9	-176,6	-47,5	6,5
X(SSAI)bT.C1	C	-167,8	43,7	80,2	79,0	-68,9	5,5
X(SSAI)bT.D1	D	-83,1	70,1	86,3	71,7	-164,4	5,8
X(SSWI)bT.B4	B	-170,2	166,5	-86,0	-177,7	-43,2	6,4
X(SSRI)bT.C1	C	-162,8	41,7	82,6	75,5	-64,2	5,5
X(SSRI)bT.B4	B	disordered					
X(SSFL.Glu)bT.B4	B	-172,6	174,6	-86,2	-175,9	-45,4	6,5
X(SSFL.Glu)bT.D1	D	-85,2	69,8	85,3	73,8	-163,2	5,8
X(triple.Glu)bT.A1	A	-170,5	174,8	-83,6	-177,5	-47,0	6,4
X(triple.Glu)bT.D1	D	-155,4	35,1	82,2	86,9	-78,7	5,5
X(triple.Glu)bT.D2	D	-174,1	47,5	78,1	77,3	-67,2	5,5

For the Arg174-variant, crystal form **X(SSRI)bT.C1** reveals the intermediate helix to be in the 'up'-conformation. In this case however, a re-registration of residues Ser171 – Ser178 has taken place, such that Ile175 takes the position otherwise occupied in all other variants by Ile176, the latter replaces Thr 177, and Ser178O makes a hydrogen bond to the carboxamide side chain of Asn233Nδ2 (**Figure 3.3-5a**). Following this reorganisation, the side chain of Arg174 forms the east side of what would be the aromatic box, with the guanidinium function in the same location as the Phe174 phenyl ring in factor Xa.

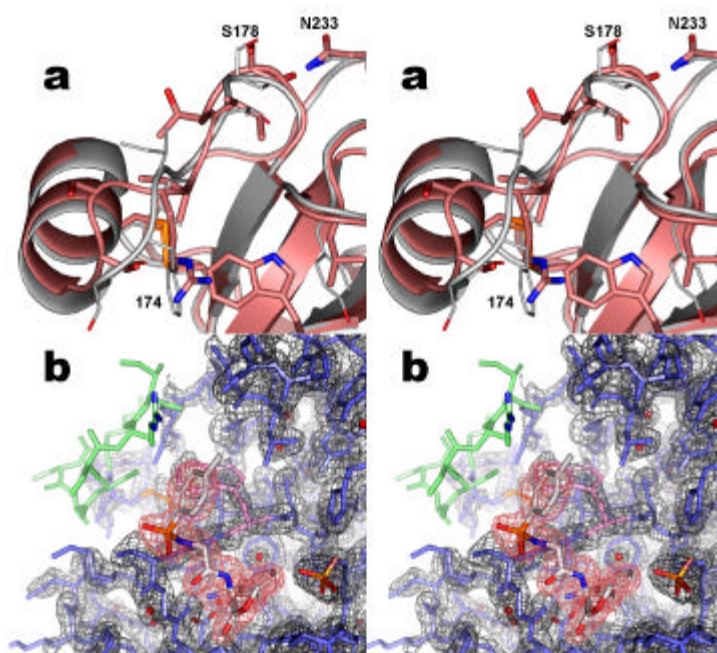


Figure 3.3-5. (a) Superposition of **X(SSRI)bT.C1** (pink) and factor Xa (silver). For simplicity, the inhibitor (**2**) is not shown. Note the re-registration of residues Ser171 – Ser178 and the formation of a hydrogen bond between Ser178O and Asn233Nδ2 in the case of **X(SSRI)bT.C1**. (b) Stereo diagram of the experimental electron density for **X(SSRI)bT.B4**; residues 169-175 (green) are disordered, and only partial density is present for Trp215 (violet). The ligand (**4**) is well defined, binding as seen in **Figure 3.3-2b**. Density for the cystine Cys168-Cys182 (orange) corresponds to the 'up'-conformation.

The same variant co-crystallised in the presence of (**4**) to form orthorhombic crystals **X(SSRI)bT.B4**. The inhibitor is bound exclusively in the conformation seen **X(SSAI)bT.B4**. In contrast to all other structures determined so far, however, residues 169-175 are disordered and only partial density is present for Trp215 (**Figure 3.3-5b**). Electron density for cystine Cys168-Cys182 corresponds to that seen in **X(SSAI)bT.C1** ('up'-conformation).

Crystal structures of Glu217 variants

Variant **X(SSFI.Glu)bT** crystallised in complex with (**4**) to form **X(SSFI.Glu)bT.B4**. The 175-loop is found in the 'down'-conformation (not shown), with the inhibitor bound as observed in **X(SSYI)bT.B4**. The carboxylate side chain of Glu217 reaches out into solution, where it makes a salt bridge to Lys224 Nζ (3Å). This in turn hydrogen bonds to Ser172O. In crystal form **X(SSFI.Glu)bT.D1**, the intermediate helix, cystine Cys168-

Cys182 and the 175-loop adopt the conformation seen in **X(SSAI)bT.D1** ('super-up', not shown). Glu217 realises an alternative rotamer to form an H-bond between Glu217O ϵ and Ser173N (3.0 Å), and to a new water molecule Wat918 (3.0Å) at the position vacated by the Phe174 side chain. The side chain of Ser172O γ hydrogen bonds to Phe174O.

For variant **X(triple.Glu)bT**, containing the complete binding site of factor Xa together with Glu217, both trigonal crystal forms P₃,21 (**A**) and P₃,21 (**D**) were obtained in the presence of benzamidine. In **X(triple.Glu)bT.A1**, the 175-loop is found in the 'down'-conformation (**Figure 3.3-6a**). As for **X(SSFI.Glu)bT.B4**, the carboxylate group of Glu217 is involved in a charge assisted hydrogen bonding network involving Glu217 O ϵ 1 and O ϵ 2, Lys224N ζ and Ser172O. The side chain of Tyr99 is perpendicular to that of Trp215 as observed for **X(triple)bT** (Rauh *et al.*, 2003), although additional electron density indicates the presence of further rotamers around χ 2 (30°-45° towards the centre of the aromatic box). In **X(triple.Glu)bT.D1**, the 175-loop is found in the 'super-up'-conformation as described for **X(SSAI)bT.D1** and **X(SSFI.Glu)bT.D1** variants (**Figure 3.3-6b**), yet disulphide Cys168-Cys182 adopts a conformation equivalent to that seen in **X(SSAI)bT.C1** ('up'-conformation) (**Table 3.3-3**). The side chain of Glu217 covers the otherwise large cavity seen in the 'super-up'-conformation of **X(SSAI)bT.D1**. As for **X(SSFI.Glu)bT.D1**, Glu217 O ϵ approaches Ser173N and coordinated Wat918; in this case, Wat918 is also coordinated by Ser172O γ (3.2Å).

Soaking of (**2**) into **X(triple.Glu)bT.D1** is accompanied by an increase in cell constant **c** by 8 Å (**Table 3.3-2**). The intermediate helix rearranges from the 'super-up'- into the 'up'-conformation, so that this entire region is now structurally indistinguishable from factor Xa (**Figure 3.3-6c**; **Figure 3.3-7**). The side chain of Glu217 is involved in an extensive hydrogen bonding network: Glu217 hydrogen bonds to Wat918 and Ser173N and O γ ; SerO γ approaches Lys224N ζ (3Å), which in turn is in contact with Ala171O. The binding mode of (**2**) soaked into crystals of **X(triple.Glu)bT.D** is equivalent to that observed for bovine trypsin at pH (Stubbs *et al.*, 2002) and rat trypsin variants X(99)rT and **X(triple)rT** (Reyda *et al.*, 2003). The chloronaphthyl moiety of the inhibitor binds deep in the primary specificity pocket, displacing water molecule Wat416. The pyridinyl group binds in the S3/S4 pocket of the enzyme variant, causing a constriction of the aromatic box. The side chain χ 2 torsion angles of Phe174 and Tyr99 rotate by 46° and 58° respectively, so that they are both parallel to the plane of the inhibitor pyridinyl group **Figure 3.3-6c**.

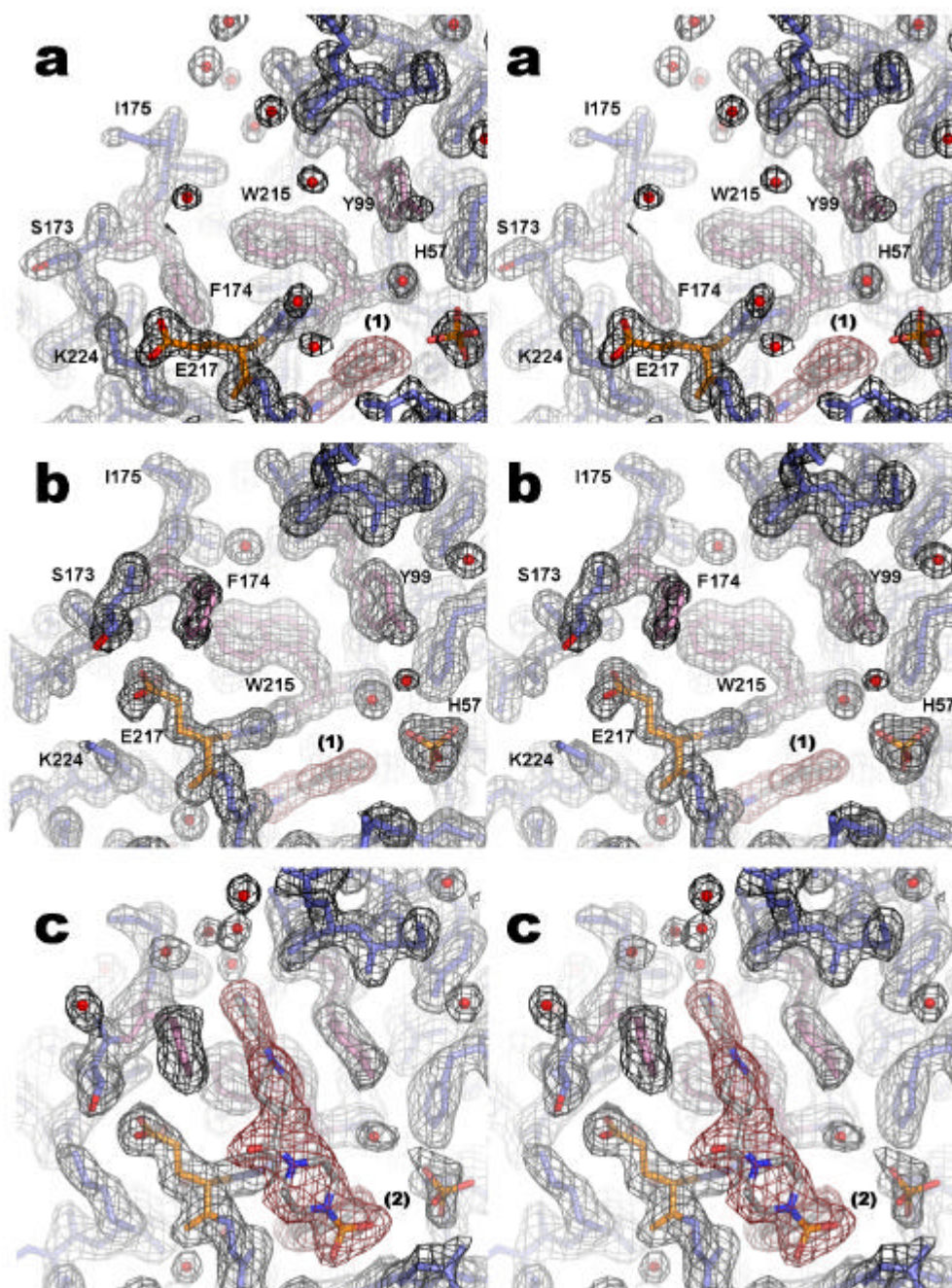


Figure 3.3-6. Stereo diagram of the experimental electron density for variant **X(triple.Glu)bT** in complex with **(1)** and **(2)** in three different conformations. **(a)** **X(triple.Glu)bT.A1** ('down'-conformation); **(b)** **X(triple.Glu)bT.D1** ('super-up'-conformation); **(c)** **X(triple.Glu)bT.D2** ('up'-conformation). Aromatic residues Tyr99, Trp215 and Phe174 are colored violet. Note the alternative rotamers adopted by Glu217 (orange) and Lys224.

3.3.4 Discussion

In this study, we set out to elucidate the cause for the discrepancy in affinity of a range of serine proteinase inhibitors for trypsin variants that were designed to be structurally equivalent to factor Xa. The crystallographic data presented here reveal that replacement of only a few residues in the 175-loop of trypsin can compromise the structural integrity of this region, resulting in manifold alterations in affinity for the ligands studied.

Before discussing the relationship between structure and affinity, it is important to understand the influence of crystal packing on conformation and binding mode. We have previously reported (Renatus *et al.*, 1998; Stubbs *et al.*, 2002) that native bovine trypsin in the presence of inhibitors tends to crystallise in crystal forms **A** or **B**. Deviations from these forms were only observed when inhibitor binding interfered with crystal packing, suggesting that the appearance of alternative crystal forms is driven by inhibitor binding conformation and not *vice versa*. By the same token, the appearance of a novel crystal form with an alternative conformation of the 175-loop indicates that this must be stable and well populated under the conditions of the crystallisation experiment. In the present study, we have been fortunate to have obtained four different crystal forms (**A** to **D**) in the presence of two different inhibitors, (**1** and **4**).

The ‘down’-conformation of the intermediate helix is observed in both crystal forms **A** and **B**. The same conformation of the helix is also observed in a completely different environment for the rat **X(triple)rT** variant (Reyda *et al.*, 2003), strongly suggesting that this architecture is a stable arrangement of the 175-loop. Similarly, the ‘up’-conformation of the helix is found in crystal form **C** (the ‘open orthorhombic’ form of native bovine trypsin commonly used for soaking experiments (Stubbs *et al.*, 2002)), and can be obtained for **X(triple.Glu)bT** in crystal form **D** as well as rat **X(triple)rT** (Reyda *et al.*, 2003) by diffusion of inhibitor (**2**) into the corresponding crystals. This architecture is also found in the molecular environment of the target molecule factor Xa (Padmanabhan *et al.*, 1993). For three of the variants, we have obtained a novel third crystal form, in which the intermediate helix is further unwound, representing the ‘super-up’-conformation.

The fact that the ‘down’-conformation in rat **X(triple)rT** and the ‘super-up’-conformation in bovine **X(triple.Glu)bT.D** can each be converted *in crystallo* to the ‘up’-conformation by binding of inhibitor (**2**) show that the energetic barriers between the three conformations described here need not be particularly large, or at least can be

compensated through ligand binding. On the other hand, we have only been able to obtain crystals of Ser172-Ser173-(Phe/Tyr)174-Ile175-containing bovine variants in the 'down'-conformation ((Rauh *et al.*, 2003); this study). While the absence of any crystals revealing an 'up'-conformation does not prove that the latter does not exist, we believe the energetic barrier is considerably higher than that for the other variants described here. Particular evidence for this comes from co-crystallisation studies with the macromolecular inhibitor aprotinin (Rauh *et al.*, in preparation). In this study, **X(SSWI)bT**-aprotinin crystallises isomorphously to bovine trypsin-aprotinin (Rühlmann *et al.*, 1973), with the intermediate helix in the 'up'-conformation; in the **X(SSFI)bT**-aprotinin complex, the 175-loop is found in the 'down'-conformation.

If we start with the premise that **X(SSFI)bT**-variants and **X(SSYI)bT**-variants are locked in the 'down'-conformation, then we can begin to rationalise the otherwise conflicting inhibition data shown in **Table 3.3-1**. The lack of increase in affinity of the factor Xa inhibitors **(2)** and **(3)** upon introduction of the factor Xa 175-loop into bovine trypsin (Rauh *et al.*, 2003) might be explained by assuming that the 'up'-conformation is required for optimal binding. Of interest is the fact that the same variants show a small but significant decrease in affinity for benzamidine **(1)** and inhibitor **(4)**. Although the latter would nominally make use of the hydrophobic box in the binding mode seen in **X(SSYI)bT.A4** (Renatus *et al.*, 1998), the considerable influence exerted by crystal packing effects (**X(SSYI)bT.B4**, **Figure 3.3-2**) suggests that the dominant interactions for this compound are provided by the benzamidino-function. The reduction in affinities for **(1)** and **(4)** compared to trypsin are difficult to explain in structural terms, although small changes in solvent structure within the primary specificity pocket may play a pivotal role.

Attempts to destabilise the 'down'-conformation by replacing **Phe174** with **Trp**, **Ala** and **Arg** yielded varying results. At one extreme, **X(SSRI)bT** showed severely compromised affinity for all of the inhibitors tested, with the relative exception of **(3)**, where only a 50-fold drop in affinity was found compared to **X(SSFI)bT**. Although it might be argued that the presence of a basic residue would be deleterious to binding the distal benzamidine of **(3)**, this is refuted by the 35nM inhibition of human tPA (Renatus *et al.*, 1998) whose S3/S4 pocket is bounded by Tyr99, Trp215 and Arg174 (Renatus *et al.*, 1997). Much more likely is the extreme plasticity of this variant, highlighted by the lack of electron density in **X(SSRI)bT.B4**. Similarly, **X(SSAI)bT** exhibits reduced affinity for inhibitors **(1)**, **(2)** and **(4)**; this variant also reveals three different conformations of the

175-region, namely the ‘down’, ‘up’ and ‘super-up’. The reduced affinity of **SSAI** for **(2)** is unlikely to be due to a lack of an aromatic side chain at position 174 if we assume that **SSFI** is locked in the ‘down’-conformation, where the ‘west’ side of the pocket would be open to solvent (see **Figure 3.3-1**).

Variant **X(SSWI)bT** exhibits a zwitter-like behaviour: affinities for the benzamidine inhibitors **(1)** and **(4)** are like those of **X(SSAI)bT** and **X(SSRI)bT**, yet affinities for the factor Xa inhibitors **(2)** and **(3)** are more like those for **X(SSFI)bT**. **X(SSWI)bT.B4** shows this variant in the ‘down’-conformation; as mentioned above, however, we observe the ‘up’-conformation in co-crystals with aprotinin (Rauh *et al.*, in preparation). This is comparable to the case for **X(triple)rT**, so that binding of **(2)** in the ‘up’-conformation, which establishes a favourable aromatic packing motif (Stubbs *et al.*, 2002), can compensate for the energetic cost of the transition from the ‘down’-conformation.

Summarising briefly the results for the **X(SSXI)bT** variants, destabilisation of the ‘down’-conformation failed to yield higher affinity interactions for factor Xa selective inhibitors **(2)** and **(3)**. Introduction of a hydrophilic group in **X(SSRI)bT**, which should have favoured the ‘up’-conformation, showed a dramatic destabilisation of the 175-region. Presumably, the energy barriers between ‘up’- and ‘super-up’ (and possibly ‘down’) are sufficiently low that no one conformation is preferred in this variant. The introduction of plasticity (or flexibility) into our target enzyme results in a loss in affinity for benzamidine **(1)** and inhibitor **(4)**. Such a loss in affinity can be compensated by stabilisation of a particular conformation (in this case ‘up’) through binding of an appropriate inhibitor such as **(2)** or **(3)**. This behaviour is also seen for the rat trypsin variant **X(triple)rT**, explaining the difference in behaviour to bovine variants **X(triple)bT**.

Thus comparisons of **X(SSXI)bT** variants provide insights into the influence of flexibility on protein-ligand affinity. How can the large difference in affinity between variants **X(triple)rT**, **X(triple)bT** and factor Xa be explained? Introduction of Glu217 into **X(SSFI)bT** results in a three-fold higher affinity for **(2)**, and a ten-fold increase for **(3)**, whilst **(1)** and **(4)** exhibit affinities similar to those for **X(SSFI)bT**. The improved affinities for the fXa inhibitors over **X(SSFI)bT** can be explained by a relative destabilisation of the ‘down’-conformation, witnessed by the appearance of the ‘super-up’-conformation in **X(SSFI.Glu)bT.D1**. Similarly, **X(triple.Glu)bT** shows a three-fold increase in affinity for **(2)** compared with **X(triple)bT**, and a 30-fold increase for **(3)**. Despite the helix in **X(triple.Glu)bT.D1** being in the ‘super-up’ form, the disulphide bridge Cys168-Cys182 adopts a conformation corresponding to that otherwise associated

with the ‘up’-conformation of the helix (**Table 3.3-3**). This in turn suggests that **X(triple.Glu)bT** may be energetically closer to the ‘up’-conformation than any of the other variants observed in crystal form **D**. This stabilisation may be a result of the extensive charge assisted hydrogen bonding network observed between Glu217, Lys224, Wat918, Ser173 and Ala171O. Inhibitor **(2)** induces the complete transformation of ‘super-up’ to ‘up’ in this crystal; we presume that this transition is responsible for the remaining 30-fold reduced affinity compared to factor Xa.

Yet this does not explain the almost perfect agreement in affinities of the bis-benzamidine inhibitor **(3)** for **X(99)rT**, **X(triple)rT**, **X(SSFI.Glu)bT**, **X(triple.Glu)bT** and **factor Xa** (**Table 3.3-1**). Inhibitor **(3)** must utilise the aromatic box – as variants seen only in the ‘down’-conformation (such as e.g. **X(triple)bT**) exhibit reduced affinity – and probably binds to factor Xa in a similar manner to **(2)**, as seen for structures of **(3)** in complex with bovine trypsin (Renatus *et al.*, 1998), tPA (Renatus *et al.*, 1997) and **X(triple)bT** (Rauh *et al.*, 2003). For three of the high affinity variants (**X(99)rT**, **X(triple)rT**, and **X(triple.Glu)bT**), we have shown that binding of **(2)** results in the formation of a factor Xa-like aromatic box, and have argued that there is an energetic cost for this conversion. If **(3)** binds to the ‘up’-conformation, shouldn’t there also be a reduction in affinity? The higher affinity of our variants for **(3)** compared to **(2)** must mean that the transition is compensated by more favourable interactions in the bound state. Yet this is counterintuitive, as binding of the other benzamidine based inhibitors **(1)** and **(4)** is weaker compared to trypsin. One possible explanation is that binding of the distal benzamidine in the aromatic pocket could favour binding of the proximal benzamidine in the primary specificity pocket and *vice versa*. Such a cooperative effect would reduce the energetic barrier to the conformational transition, resulting in high affinity binding.

3.3.5 Conclusions

The results presented here highlight the complexities inherent in deriving affinity data from three-dimensional structures. In the current paper, we have attempted to explain our data based upon the assumption that **X(SSFI)bT** and factor Xa represent stable conformations that define the limits of conformational flexibility (‘down’ and ‘up’-conformations respectively). This is likely to be an oversimplification – indeed, we have previously suggested that conformational plasticity in the intermediate helix may be a driving force behind cofactor induced activity modulation in haemostatic proteinases

(Reyda *et al.*, 2003). The conformation we observe in the crystals represent individual sub-states within a spectrum of possible three-dimensional structures. The lower the energy barrier between these sub-states is, the more likely we are to observe alternative enzyme architectures.

Thus, variants containing an aromatic residue at position 174 would tend to populate the ‘down’-conformation: burial of the side chain would be preferred over solvent exposure of the hydrophobic moiety, providing a driving force for the reorganisation of the intermediate helix. Variants with a hydrophilic side chain would favour surface exposure of residue 174, shifting the equilibrium between various sub-states. The relative frequencies of these sub-states in a thermodynamic ensemble may be the cause of the differential affinities observed for the various inhibitors and variants.

The complexity of the situation is summarised in **Figure 3.3-7**. The structures of **X(triple)rT.2**, **X(triple.Glu)bT.D2** and factor Xa are virtually identical, yet affinity data for inhibitors **(1)**, **(2)** and **(3)** vary considerably. Only by understanding the underlying conformational variability are we able to make sense of the measured inhibition constants. If one hypothesises that each inhibitor binds preferentially to the ‘up’-conformation, then any departure to the ‘down’ or ‘super-up’ (or any other as yet not observed) state would result in an effective reduction in concentration of the ‘active’ component, in turn reducing affinity. Alternatively, dynamic exchange between the various sub-states could reduce affinity for unadapted inhibitors through an inability to form defined directed interactions.

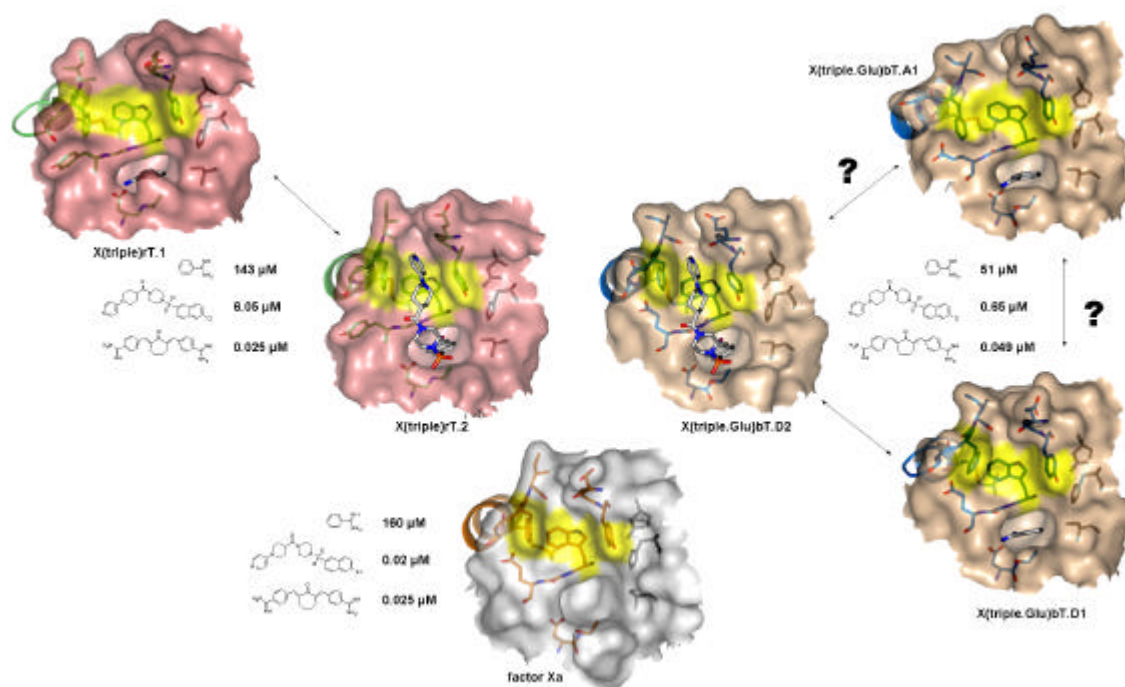


Figure 3.3-7. Solvent accessible surface representations of the binding sites of factor Xa (white), **X(triple)rT** (pink; ‘down’- and ‘up’-conformations) and **X(triple)bT** (brown; ‘down’-, ‘super-up’- and ‘up’-conformations). Transitions to the ‘up’-conformation have been observed *in crystallo* upon binding of inhibitor (**2**) (‘down’ to ‘up’ for **X(triple)rT** and ‘super-up’ to ‘up’ for **X(triple)bT**). The differences in inhibition constants for (**1-3**) are presumably a result of differing equilibria between the sub-states shown.

Conformational flexibility in protein ligand interactions is nothing new – numerous cases have been reported, including thrombin (Engh *et al.*, 1996), protein kinase (Prade *et al.*, 1997), the oestrogen receptor (Brzozowski *et al.*, 1997) and aldose reductase (Urzhumtsev *et al.*, 1997) (reviewed in (Davis & Teague, 1999)). Until now, however, estimation of the energetic costs of such ligand induced changes have been difficult to quantify physicochemically. Using the model system presented here, we are now in a position to attempt factorisation of the multitude contributions to ligand affinity. Aided by the fortuitous nature of bovine trypsin and its variants to crystallise in multiple crystal forms, it is possible to visualise the extent of conformational variability, and relate this to the protein-ligand interaction. Clearly, many aspects such as solvation and desolvation or enthalpic and entropic contributions remain open questions. Further studies of the energetics and dynamics of these processes will give us a better understanding of what makes a protein attractive for a ligand, which in turn will assist in the search for novel candidate drugs of the future.

3.3.6 Materials and Methods

Mutagenesis, expression, refolding and purification of the variants

Bovine trypsin variants reported here were constructed by site-directed mutagenesis using the QuickChange™ kit (Stratagene) (Papworth *et al.*, 1996). Mutations were introduced using pairs of complementary primers to replace Phe174 in variant **X(SSFI)bT** by Tyr, Trp, Ala and Arg. In addition, Ser217 of variant **X(SSFI)bT** and **X(triple)bT** was modified to Glu. All primers used are listed in **Table 3.3-4**. The amplified DNA was transformed in *E. coli* strain BL21(DE3)pLys; the insoluble protein was successfully refolded with the methods and conditions described previously (Rauh *et al.*, 2003). Refolded trypsinogen was activated to trypsin by cleavage with bovine enterokinase (Merck KGaA, Darmstadt, Germany); activated trypsin was purified and concentrated by FPLC using soybean trypsin inhibitor covalently bound to agarose (SIGMA) (Hedstrom *et al.*, 1996).

Table 3.3-4. Oligonucleotides used to construct the bovine trypsin variants. Mismatched base pairs are bold and underlined.

template	mutagenic primers																3'	variant
X(SSFI)bT	gaa	cat	gtt	gct	ggt	gat	tat	<u>gta</u>	tga	gga	ggc	act	ttt	gca	aga	gct	X(SSYI)bT	
	agc	tct	tgc	aaa	agt	gcc	tcc	tca	<u>tac</u>	ata	atc	acc	agc	aac	atg	ttc		
X(SSFI)bT	gaa	cat	gtt	gct	ggt	gat	tat	<u>ggc</u>	tga	gga	ggc	act	ttt	gca	aga	gct	X(SSAI)bT	
	agc	tct	tgc	aaa	agt	gcc	tcc	tca	<u>ggg</u>	ata	atc	acc	agc	aac	atg	ttc		
X(SSFI)bT	gaa	cat	gtt	gct	ggt	gat	tat	<u>cca</u>	tga	gga	ggc	act	ttt	gca	aga	gct	X(SSWI)bT	
	agc	tct	tgc	aaa	agt	gcc	tcc	tca	<u>ggg</u>	ata	atc	acc	agc	aac	atg	ttc		
X(SSFI)bT	gaa	cat	gtt	gct	ggt	gat	tat	<u>acg</u>	tga	gga	ggc	act	ttt	gca	aga	gct	X(SSRI)bT	
	agc	tct	tgc	aaa	agt	gcc	tcc	tca	<u>ggg</u>	ata	atc	acc	agc	aac	atg	ttc		
X(SSFI)bT	ggt	ttt	ctg	agc	gca	gcc	<u>ctg</u>	gcc	cca	gga	gac	aat	gcc	X(SSFI.Glu)bT				
	ggc	att	gtc	tcc	tgg	ggc	<u>cag</u>	ggc	tgc	gct	cag	aaa	aac					
X(triple)bT	ggt	ttt	ctg	agc	gca	gcc	<u>ctg</u>	gcc	cca	gga	gac	aat	gcc	X(triple.Glu)bT				
	ggc	att	gtc	tcc	tgg	ggc	<u>cag</u>	ggc	tgc	gct	cag	aaa	aac					

Kinetic characterisation of the mutants

Kinetic activity and inhibition data of the 6 bovine trypsin variants were determined photometrically using the chromogenic substrate Pefachrome-tPa (Loxo GmbH, Dossenheim, Germany) according to the protocols described by Stürzebecher (Stürzebecher *et al.*, 1989) under the following conditions: 50mM Tris/HCl pH8.0, 154

mM NaCl, 5% ethanol and addition of 10mM CaCl₂ at 25°C using different concentrations of substrate and inhibitor. Benzamidine (**1**) was purchased from Merck KGaA, inhibitor (**2**) was kindly provided by Merck KGaA, while inhibitors (**3**) and (**4**) were kindly provided by Dr Jörg Stürzebecher. Ki-values were determined as described by Dixon (Dixon, 1972).

Crystallisation, data collection and structure analysis

Prior to co-crystallisation, trypsin variants were preincubated for several hours with 10 mg/ml inhibitor in 1 mM HCl, 10 mM CaCl₂. CocrySTALLISATION was carried out at room temperature using vapour diffusion, with a final protein concentration of 5 mg/ml. The trigonal crystals **A** and orthorhombic ‘closed’ crystals **B** grew in 0.1 M imidazole pH 7-8, 0.1-0.3 M ammonium sulphate and 20-30% polyethyleneglycol 8000 after a few weeks. Crystals were measured in capillaries. Orthorhombic ‘open’ crystals **C** of the variants grew within one day after seeding with wild-type ‘open’ orthorhombic crystals. Crystals of variant **X(SSAI)bT** of the new space group **D** grew under the same conditions at room temperature after 3 days, whereas crystals of **X(triple.Glu)bT.D1** grew at 40°C after ca. 10 days. After measurement, the same **X(triple.Glu)bT.D1** crystal was returned to the hanging drop containing saturating amounts of inhibitor (**2**) for 3 hours to produce **X(triple.Glu)bT.D2**. Crystallisation conditions for all variants are given in **Table 3.3-2**.

Crystals were measured in glass capillaries at room temperature. X-ray data were collected in house using an R-AxisIV++ image plate system (MSC, Texas) installed on a Rigaku rotating anode generator, and evaluated with DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) or CrystalClear™ 1.3 (MSC, Texas). Starting coordinates were taken from (Rauh *et al.*, 2002). Conventional crystallographic refinement (rigid body, positional, temperature factor) was carried out using CNS (Brünger *et al.*, 1998). Molecular models of the inhibitors were constructed using SYBYL (Tripos Associates) and model building performed using O (Jones *et al.*, 1991). Target values for bond length and angle refinement of the inhibitors were those obtained after conjugate gradient energy minimisation in SYBYL; planarity constraints were applied only weakly, while all dihedral angles were left free to rotate. Initial phases for the structure **X(SSAI)bT.D1** of the new space group **D** were obtained by molecular replacement using CNS (Brünger *et al.*, 1998), with crystal structure **X(SSAI)bT.A1** as search model. An additional sulphate close to the 99-loop is found in this crystal form. Data collection and refinement statistics are given in **Table 3.3-2** and **Table 3.3-5**.

Table 3.3-5. Refinement statistics.

structure	number of non hydrogen atoms per asymmetric unit				rms deviation		R_{work} (%)	R_{free} (%)
	protein	ions	solvent	inhibitor	bond	angles		
X(SSYI)bT.A4	1629	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	61	30	0.0059	1.317	21.2	25.4
X(SSYI)bT.B4	1629	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	136	30	0.0049	1.357	18.6	19.6
X(SSAI)bT.B4	1622	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	62	30	0.0056	1.317	18.6	23.3
X(SSAI)bT.C1	1622	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	53	9	0.0056	1.305	22.2	24.9
X(SSAI)bT.D1	1622	1 Ca^{2+} ; 2 SO_4^{2-}	112	9	0.0046	1.353	18.9	22.5
X(SSWI)bT.B4	1631	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	61	30	0.0056	1.317	18.6	22.2
X(SSRI)bT.C1	1629	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	51	9	0.0051	1.320	21.6	24.1
X(SSRI)bT.B4	1568	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	88	30	0.0049	1.343	19.8	23.0
X(SSFLGlu)bT.B4	1631	1 Ca^{2+} ; 2 SO_4^{2-}	117	9	0.0047	1.342	19.5	21.7
X(SSFLGlu)bT.D1	1631	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	61	30	0.0057	1.351	21.0	23.6
X(triple.Glu)bT.A1	1635	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	117	9	0.0049	1.283	21.3	23.6
X(triple.Glu)bT.D1	1635	1 Ca^{2+} ; 2 SO_4^{2-}	126	9	0.0044	1.342	19.0	20.0
X(triple.Glu)bT.D2	1635	1 Ca^{2+} ; 1 SO_4^{2-}	95	34	0.0057	1.300	19.1	22.2

3.3.7 Acknowledgements

The authors thank Torsten Luksch and Christian Sohn for technical help. We are particularly grateful to Jörg Stürzebecher, to Pentapharm Ltd., Basel, Switzerland and to Merck KGaA, Darmstadt, Germany for supplying inhibitors. This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Graduiertenkolleg “Proteinfunktion auf atomarer Ebene”.

3.4 Röntgenkristallstrukturen der Trypsinvarianten mit Aprotinin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Reihe von Komplexstrukturen der Trypsinvarianten mit dem Proteaseinhibitor Aprotinin röntgenkristallographisch vermessen (Tabelle 3.4-1).



Inhibitoren ausschließlich zur kristallographischen Charakterisierung verwendet	
Aprotinin (Trasylol®)	Aprotinin-Arg15 Variante
	
hoch affiner Serinprotease Inhibitor	hoch affiner Serinprotease Inhibitor

Tabelle 3.4-1. Die Tabelle zeigt Komplexstrukturen aus Trypsinvarianten und dem peptidischen Inhibitor Aprotinin-Arg15.

Nr.	Variante	Inhibitor	Raumgruppe	Zellkonstanten					
				a (Å)	b (Å)	c (Å)	a°	b°	g°
1	Trypsin	Aprotinin-Arg15	I222	75.78	85.24	122.65	90	90	90
2	X(99)bT	Aprotinin-Arg15	I222	75.77	85.40	122.80	90	90	90
3	X(SSWI)bT	Aprotinin-Arg15	I222	75.78	85.59	122.72	90	90	90
4	X(SSFI)bT	Aprotinin-Arg15	P22 ₁ 2 ₁	76.15	82.87	119.74	90	90	90

Aprotinin gehört zur Familie der Kunitz-Inhibitoren und wird auch als BPTI (*Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor*) bezeichnet. Das einkettige, aus 58 Aminosäuren bestehende und über drei Disulfidbrücken stabilisierte Protein wurde in seiner 3D-Struktur von Huber *et al.* röntgenkristallographisch aufgeklärt (Huber *et al.*, 1970). Aprotinin inhibiert Trypsin mit 60 fM überaus effektiv. Die Trypsin-Aprotinin-Komplexstruktur (Rühlmann *et al.*,

1973) zeigt, dass Aprotinin mit seiner „aktiven“ Schleife in einer substratähnlichen Weise, definiert als der kanonische Bindungsmodus¹⁶, an Trypsin bindet.

Die starke Bindung an Trypsin, die definierte Schnittfläche aus 38 Aminosäuren (14 Aminosäuren des Inhibitors und 24 Aminosäuren des Enzyms), die an der Komplexbildung beteiligt sind, sowie die leichte rekombinante Zugänglichkeit, machen Aprotinin in der Erforschung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu einem überaus wertvollen Werkzeug.

Durch die Kokristallisation der Trypsinvarianten mit einem makromolekularen Inhibitor wird sich zwangsläufig die molekulare Umgebung des Enzyms verändern. Von besonderem Interesse war dies für Varianten des X(.../175/...)bT-Typs, da diese bis dato ausschließlich in der geschlossenen trigonalen Raumgruppe P3₁21 kristallisierten (**Tabelle 5-1**, Seite 92).

Das Ziel dieser Experimente war es, durch eine alternative Umgebung die Frage zu beantworten, ob die bisher ausschließlich beobachtete *down*-Konformation eine Eigenschaft der X(.../175/...)bT-Varianten oder auf die molekulare Packung in der Kristallform P3₁21 zurückzuführen ist.

Neben Aprotinin-Arg15 wurde auch natives Aprotinin für die Kokristallisation verwendet. Jedoch wuchsen Kristalle der hier vorgestellten Varianten nur bei den unten aufgeführten Bedingungen einzig mit Aprotinin-Arg15. Ein vertieftes Kristallisations-Screening wurde nicht durchgeführt. Die Komplexe kristallisierten innerhalb weniger Tage aus 2,3 M MgSO₄ – Lösung bei einem pH-Wert von 6,9. Die Proteinkonzentration an Trypsin betrug dabei 10 mg/ml und an Inhibitor 3,8 mg/ml. Kristallbildung erfolgte mit der Methode des „Hängenden Tropfens“ in 3 µl Proteinlösung, vermischt mit 1 µl der Bodenlösung.

Während Trypsin in Anwesenheit von Aprotinin und Aprotinin-Arg15 in der Raumgruppe I222 (Nr. 1, **Tabelle 3.4-1**) mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit kristallisiert, kommt es beim Komplex aus **X(SSFI)bT** und Aprotinin-Arg15 zur Ausbildung von Kristallen, in der für den Trypsin-Aprotinin-Komplex bis dahin neuen Raumgruppe P2₁2₁ (Nr. 4, **Tabelle 3.4-1**) mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit. Offensichtlich ist eine kristallographische 2-zählige Achse zu einer lokalen

¹⁶ Ausbildung eines antiparallelen β -Faltblattes zwischen der aktiven Schleife des Aprotinins und Trypsins.

2-zähligen Achse geworden. Die Struktur dieses Komplexes konnte mit Hilfe des Molekularen Ersatzes gelöst werden und zeigt den Verlauf der 175-Schleife beider unabhängiger Moleküle in der bereits beobachteten *down*-Konformation. Diese Beobachtung ist ein weiterer wichtiger Hinweis für die Annahme, dass es sich bei der *down*-Konformation der Rindertrypsinvarianten im Gegensatz zu der Rattentrypsinvariante (Reyda *et al.*, 2003) um eine stabile Konformation handeln muss.

Überraschend führten Kristallisationsexperimente mit der Trypsin Variante **X(SSWI)bT** im Komplex mit Aprotinin-Arg15 zu Kristallen in der Raumgruppe I222 (Nr. 3, **Tabelle 3.4-1**). Die Konformation der Disulfidbrücke Cys168-Cys182 sowie der Verlauf der 175-Schleife zeigen klar das Vorliegen der *up*-Konformation, obwohl die Elektronendichte der Seitenkette des eingefügten Trp174 ungeordnet ist. Die gleiche Variante im Komplex mit dem niedermolekularen Inhibitor ST800 (**Tabelle 1-4**, Seite 24) kristallisiert in Raumgruppe P2₁2₁2₁ (a=55.05, b=55.97, c=68.53, $\alpha=90$, $\beta=90$, $\gamma=90$) in der *down*-Konformation. Der Bindungsmodus von Aprotinin-Arg15 bleibt durch die beobachteten Veränderungen in der 175-Schleife unbeeinflusst und ist strukturgleich mit dem Komplex aus Trypsin und Aprotinin-Arg15 (**Abb. 3.4-1**).

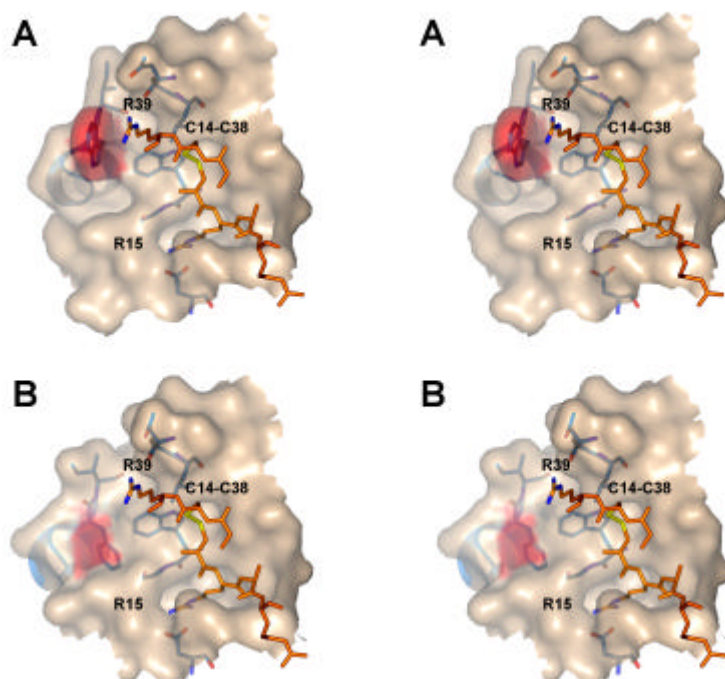


Abb. 3.4-1 Lösungsmittelzugängliche Oberfläche der Bindetaschen von Trypsinvariante **X(SSWI)bT** [A] und **X(SSFI)bT** [B] im Komplex mit Aprotinin-Arg15. Ausgewählte Aminosäuren des Liganden sind orange eingefärbt. Rot hinterlegt ist Position 174 der Trypsinvarianten.

Bis zum Vorliegen dieser Komplexstruktur wurde die *up*-Konformation der 175-Schleife nur bei den in **Tabelle 3.4-1** unter 1-3 aufgeführten bovinen Trypsinvarianten vorgefunden.

Tabelle 3.4-1 Die Tabelle zeigt Komplexstrukturen zwischen Trypsinvarianten und Liganden, in denen die 175-Schleife in der *up*-Konformation vorliegt.

Nr.	Variante	Inhibitor	Raumgruppe	Zellkonstanten					
				<i>a</i> (Å)	<i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	<i>a</i> °	<i>b</i> °	<i>g</i> °
1	X(SSAI)bT	Benzamidin	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	61.63	70.58	64.13	90	90	90
2	X(SSRI)bT	Benzamidin	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	61.10	70.34	64.15	90	90	90
3	X(triple.Glu)bT	Zeneca (<i>soaked</i>)	P3 ₂ 21	54.75	54.75	144.07	90	90	120
4	X(SSWI)bT	Aprotinin-Arg15	I222	75.78	85.59	122.72	90	90	90

Wie bereits in Abschnitt 3.3 geschildert, induziert das Eindiffundieren (*soaken*) der Zeneca-Verbindung in Kristalle der **X(triple.Glu)bT**-Variante strukturelle Änderungen von der *super-up*- in die *up*-Konformation. Übertragen auf die Komplexstruktur aus **X(SSWI)bT** mit Aprotinin-Arg15 wäre auch hier das Stabilisieren der *up*-Konformation durch Strukturelemente des Liganden denkbar. Geht man davon aus, dass in Lösung „Gleichgewichte“ zwischen den drei bisher beobachteten Konformationen der 175-Schleife (*down*, *up* und *super-up*) existieren, so würde zunächst die *down*-Konformation durch den größeren Platzbedarf der Seitenkette von Trp174 (im Vergleich zur Seitenkette von Phe174 der **X(SSFI)bT** Variante) das Gleichgewicht in Richtung der *up*- bzw. *super-up*-Konformation verschoben werden. Die in der Struktur gefundene *up*-Konformation könnte dann infolge einer Kation- π -Wechselwirkung der Seitenkette von Trp174 mit der in den Bereich der hydrophoben Tasche hineinreichenden Seitenketten von Arg39 des Liganden zusätzlich stabilisiert werden (**Abb. 3.4-2**).

Derzeit liegen noch keine kinetischen Daten bezüglich der Komplexe aus Aprotinin-Arg15 und den diskutierten Trypsinvarianten vor. Zusätzliche Mutationsstudien mit Aprotinin-Varianten könnten zu einer Klärung der diskutierten Sachverhalte beitragen und das hier vorgestellte Modellsystem um weitere Hinweise für die Interpretation ergänzen. Auch stellt sich die Frage, ob eine mögliche Protonierung des Pyridin-Strukturelements der Zeneca-Verbindung zu einer Stabilisierung der in der Komplexstruktur mit **X(triple.Glu)bT** beobachteten *up*-Konformation beiträgt (siehe auch Abschnitt 3.3).

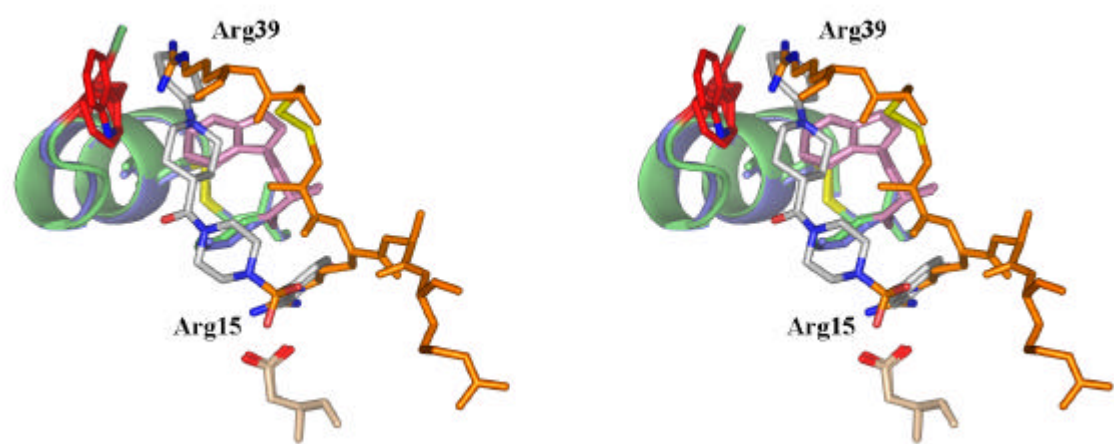


Abb. 3.4-2 Überlagerte Strukturen der Komplexe aus **X(SSWI)bT (hellgrün)** und Aprotinn-Arg15 (**orange**) sowie aus **X(triple.Glu)bT (graublau)** und Zeneca (**weiß**). Für die Betrachtung wichtige Aminosäuren sind wie folgt eingefärbt: **rot**, Aromaten (Trp, Phe) in Position 174; **violett**, Trp215; **beige**, Asp189; **gelb**, Disulfidbrücken.

Struktur	Raumgruppe	Zellkonstanten			beobachtete/unabhängige Reflexe	R_{sym}^a
		$a(\text{\AA})$	$b(\text{\AA})$	$c(\text{\AA})$		
X(SSWI)bT.Aprotinin-Arg15	I222	75.78	85.59	122.72	90580/27403	15.3% (100-2.0Å) 46.8% bei 2.07Å
X(SSFI)bT.Aprotinin-Arg15	P22 ₁ 2 ₁	76.15	82.87	119.74	255595/83486	15.0% (100-1.70Å) 58.6% bei 1.76Å

$$^a R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$$

Struktur	Anzahl der nicht Wasserstoffatome pro asymmetrische Einheit				rms deviation		$R_{\text{work}}(\%)$	$R_{\text{free}}(\%)$
	Protein	Ion	Solvent	Inhibitor	bond	angles		
X(SSWI)bT.Aprotinin-Arg15	1631	1 Ca ²⁺	84	456	0.0053	1.267	18.2	21.6
X(SSFI)bT.Aprotinin-Arg15	3256	2 Ca ²⁺	207	912	0.0051	1.330	21.3	23.7

3.5 Untersuchungen zur Substratspezifität der Trypsinvarianten

Zur genaueren Charakterisierung der erhaltenen 14 Trypsinvarianten bezüglich ihrer Substratspezifität konnte während eines Forschungsaufenthaltes am *Genomics Institute of the Novartis Foundation* (GNF), San Diego, in der Proteaseabteilung bei Frau Dr. Jennifer Harris diese Fragen experimentell näher erörtert werden. Das GNF verfügt über eine kombinatorisch generierte Bibliothek fluorogener Tetrapeptide (Harris *et al.*, 2000). Als Fluorophor dient das für die Festphasensynthese geeignete Methylcumarinderivat ACC^{17} , welches zudem eine um Faktor 100 höhere Quantenausbeute besitzt als das standardmäßig verwendete AMC^{18} .

Unser Interesse galt Teilbibliotheken mit vorgegebener Aminosäure in Substratposition P1 (Lysin oder Arginin) und variabler Belegung in den Positionen P2, P3 und P4 (siehe **Abb. 3.5-1**). Die hohe Quantenausbeute des Fluorophors sowie der Einsatz von Mikrotitertechniken (*384iger-Platten*) erlaubte die zu verwendende Enzymkonzentration auf 2500-500 pM zu reduzieren.

Die Hydrolyse der Substrate erfolgte bei 25°C in einer wässrigen Lösung aus 50 mM Tris/HCl, 154 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$ sowie 5% Ethanol bei pH 8,0. Anregung erfolgte bei 380 nm, die Messung der Fluoreszenz bei 450 nm. Als Maß für die Aktivität der einzelnen Varianten gegenüber den Substraten wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität über der Zeit gewählt (Steigung). In den nachstehenden **Abb. 3.5-2** und **Abb. 3.5-3** werden diese Werte relativ zu den Werten von Faktor Xa angegeben.

Wie leistungsfähig die genannte Methode zur Erstellung von Substratprofilen der hier vorgestellten Trypsinvarianten ist bzw. wie der Austausch einer Aminosäure innerhalb der Bindetasche das Substratprofil der Trypsinvarianten signifikant beeinflussen kann, soll anhand der beiden nachstehenden Beispiele exemplarisch kurz erläutert werden.

¹⁷ 7-Amino-4-carbamoyl-methylcumarin

¹⁸ 7-Amino-4-methylcumarin

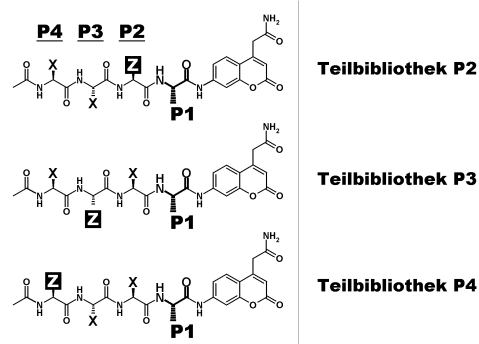


Abb. 3.5-1 Diese Abbildung zeigt die drei verwendeten Substratbibliotheken. Position P1 wurde mit Arginin oder Lysin konstant gehalten, während die Positionen P2 bis P4 mit unterschiedlichen vorgegebenen Aminosäuren (**Z**) und einer zufälligen Mischung aus einer Menge von 19 Aminosäuren (**X**) besetzt wurden. Es wurden proteinogene Aminosäuren und nLeu verwendet. Cystein wurde nicht eingesetzt, Methionin durch Nor-Leucin ersetzt.

3.5.1 Veränderte Substratspezifität des Trypsins in P1 durch A190

Wie bereits in Abschnitt 1.4.4 ausgeführt, besitzt Trypsin eine ausgeprägte Substratspezifität für Arginin und Lysin in P1. Faktor Xa hingegen besitzt eine reduzierte P1-Spezifität für Lysin. Bei allen Trypsinvarianten mit einem Alanin in Position 190 (Abschnitt 1.4.7) konnte analog zu Faktor Xa, neben einer hohen Spezifität für Arginin, in P1 eine stark reduzierte Präferenz für Lysin gefunden werden. In **Abb. 3.5-2** ist dieser Trend beispielhaft für alle Trypsinvarianten mit einem Alanin in Position 190 anhand der X(190)bT-Variante gezeigt.

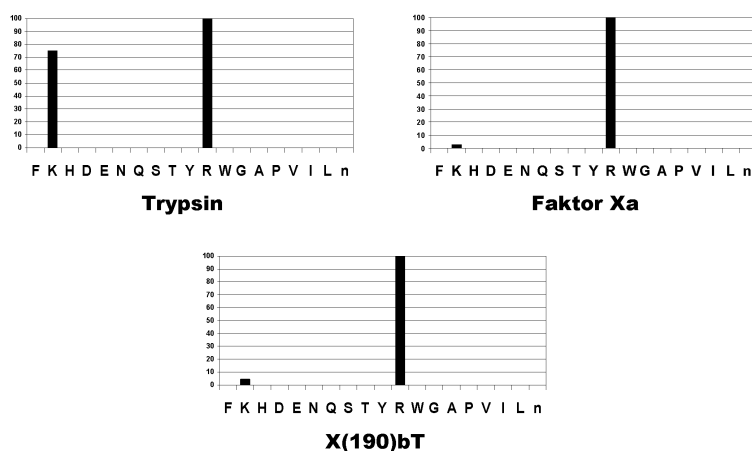


Abb. 3.5-2 Relative Aktivitäten gegenüber Arginin und Lysin (in P1) von Trypsin, Faktor Xa und der Trypsinvariante X(190)bT. Die Abszisse enthält die verwendeten Aminosäuren in P1 (n = Norleucin). Die Ordinate zeigt die auf Faktor Xa relativ bezogenen Aktivitäten (in %).

Wie bereits in Abschnitt 1.4.4 erwähnt, stabilisiert der γ -Sauerstoff der Ser190-Seitenkette die Bindung von Lysin-Seitenketten durch ein Wasserstoffbrücken vermittelndes Wassermolekül. Entfällt durch den Austausch des Serins gegen ein Alanin diese wasservermittelte Wechselwirkung, so geht die vergleichbar gute molekulare Erkennung von Lysin und Arginin in nativem Trypsin zugunsten einer nahezu ausschließlichen Bevorzugung des Arginins verloren (Perona & Craik, 1995; Perona & Craik, 1997; Sichler *et al.*, 2002).

3.5.2 Die 99-Schleife als Determinante für die P2-Spezifität von Faktor Xa

Faktor Xa besitzt eine Präferenz gegenüber der Aminosäure Glycin in Position P2 (Abschnitt 1.4.4). Wie **Abb. 3.5-3** zeigt, verfügen alle Trypsinvarianten mit veränderter 99-Schleife ebenfalls über eine ausgeprägte Spezifität gegenüber Glycin in P2.

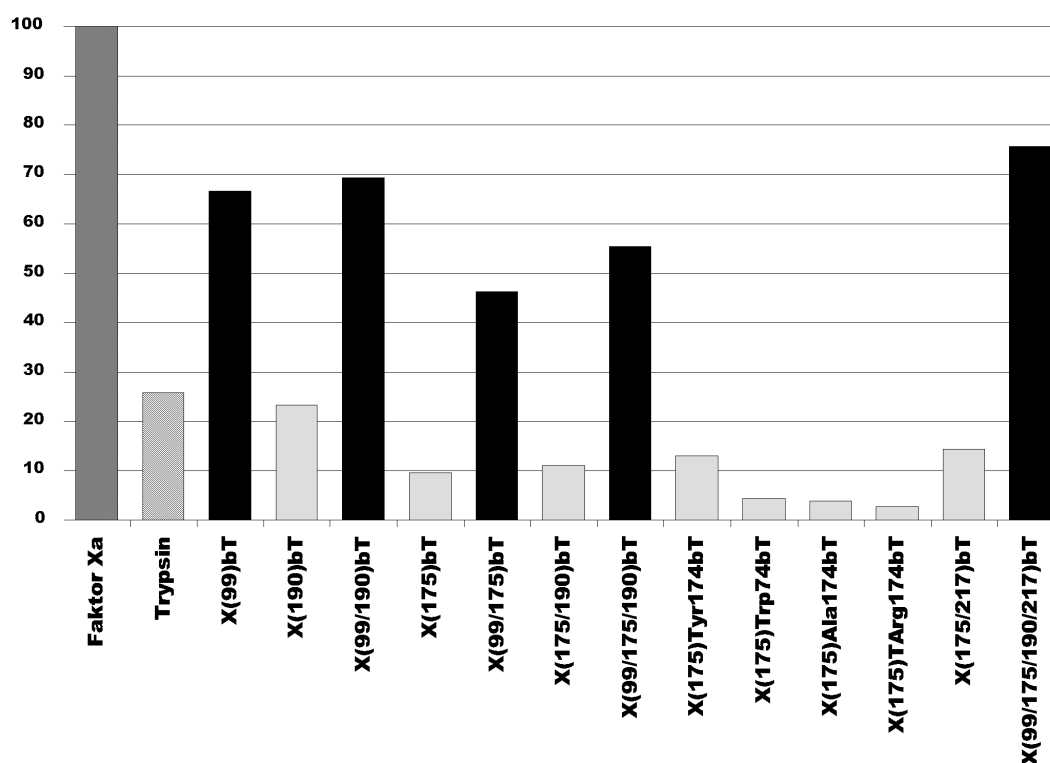


Abb. 3.5-3 Substratspezifitäten von Faktor Xa, Trypsin und Varianten gegenüber Glycin in Position P2. Ausgeprägte Spezifität bei Varianten mit eingeführter 99-Schleife (schwarz). Die Abszisse enthält die vermessenen Enzyme. Die Ordinate zeigt die auf Faktor Xa (100%) relativen bezogenen Aktivitäten in Prozent (gemessen mit **Teilbibliothek P2** Abb. 3.5-1).

Die erhöhte Spezifität gegenüber Glycin lässt sich durch die Anwesenheit der Seitenkette von Tyr99 erklären, durch welche der Zugang zur S2-Tasche für andere Aminosäuren außer Glycin erschwert wird (Padmanabhan *et al.*, 1993). An dieser Stelle sei an die Bedeutung des Seitenkette von Tyr99 im Fall des bisbenzamidischen Inhibitors (ST353) (**Abschnitt 3.2**, Seite 39) erinnert, die eine Bevorzugung des Z,Z-Isomers zur Folge hat.

Die hier vorgestellten Experimente geben keine absoluten Werte wieder, sondern zeigen Tendenzen auf und geben Impulse für die weitere exakte Charakterisierung der Trypsinvarianten mit Einzelsubstraten aus den Bibliotheken.

4 Vergleichende Aspekte der Diskussion und Perspektive

Am Anfang dieser Arbeit stand die konzeptionelle Idee, Bindetaschen strukturell nicht charakterisierter Rezeptoren auf verwandte Proteine zu übertragen. Die kinetische und röntgenkristallographische Charakterisierung dieser Chimären sollte Impulse für das rationale Wirkstoff Design liefern.

Im Verlauf der Arbeit verlagerte sich der Schwerpunkt dieses Konzepts mehr in Richtung zum Verständnis physikochemischer Zusammenhänge von Protein-Ligand-Wechselwirkungen auf atomarer Ebene, vor allem in Hinblick auf die Charakterisierung selektivitätsbestimmender Faktoren.

Wir haben an konkreten Beispielen verdeutlichen können, dass es nicht *die* Kristallstruktur eines Proteins gibt. Die Röntgenkristallstruktur eines Proteins ermittelt ein statisches, räumlich und zeitlich in einem Kristall gemitteltes Abbild (oder „Frame“), das wiederum eine eingefrorene Momentaufnahme („Frame“) eines dynamischen Prozesses sein kann, der sich unter Bedingungen, die den Molekülen mehr Freiheiten erlaubt (z.B. in Lösung), abspielen kann. Zeitliche Veränderungen, z.B. in der Orientierung von Seitenketten oder der Wasserstruktur, können oft nur indirekt durch ungenügend definierte Dichte bzw. alternative Konformationen in der gleichen oder in verschiedenen Kristallformen abgeschätzt werden. Viele Proteine erlauben keine Variationen in den Kristallisationsbedingungen. Das primäre Interesse beim Ermitteln der Struktur ist in aller Regel zunächst (und verständlicherweise) größer als systematische Analysen der Bedingungen, unter denen die Moleküle zu kristallinen Verbindungen aggregieren. Nur wenige Systeme erlauben bisher einen tieferen Einblick, wie sich aus

voneinander abweichenden Nukleationsbedingungen unterschiedliche Packungsmuster ergeben, die in aller Regel mit der Kristallisation in anderen Raumgruppen einhergehen. Kristalle eines Zielproteins zeigen eine Fülle an wichtigen Informationen, insbesondere wenn man über Systeme verfügt, die das Eindiffundieren von Liganden in den Kristall erlauben. Auf der anderen Seite kann der Experimentator bisher nur nachträglich registrieren, was und wie kristallisiert wurde bzw. ist der Experimentator in der Perspektive der Betrachtung gefangen (er sieht nie das, was nicht kristallisiert werden konnte). Die Eigenschaft von Trypsin, multiple Kristallformen unter weitgehend ähnlichen Bedingungen zu bilden, ist ein „kleiner Luxus“ und vermutlich keine Besonderheit dieses Enzyms. In den letzten Jahren sind aufgrund des Interesses an z.B. Thrombin und der HIV-Protease als pharmazeutische Zielproteine eine ganze Reihe von Strukturen entstanden, für die ebenfalls das Auftreten von multiplen Kristallformen beobachtet werden konnte (Stubbs & Bauer, 1999). Gleichwohl wurden viele der Strukturen nicht veröffentlicht.

Weitgehende Akzeptanz findet heute die Annahme, dass Röntgenkristallstrukturen von Proteinen der tatsächlichen und repräsentativ relevanten Struktur und Faltung eines Proteins im biologischen System entspricht. Dennoch haben wir zahlreiche Beispiele zeigen können, in denen flexible Bereiche der Proteinoberfläche durch veränderte Umgebungen (z.B. Kristallkontakte oder Liganden) in der Konformation von Aminosäureseitenketten, Orientierung von Schleifen oder ganzer Domänen beeinflusst werden. Umgekehrt können Bedingungen, die zur Kristallisation führen, das Erscheinungsbild eines Proteins beeinflussen (Stubbs *et al.*, 2002). Für das Ergebnis, wie die Struktur des Protein-Ligand Komplexes aussieht, kann es auch entscheidend sein, ob eine Kokristallisation oder ein Eindiffundieren in vorgegebene Kristalle vorgenommen wurde (siehe Abschnitt 3.2 Strukturen des Liganden ST353 mit den Trypsin-Varianten). Selbst kleine Liganden können einen Einfluss auf die bei der Kristallisation sich durchsetzende Kristallpackung nehmen (Renatus *et al.*, 1998). Der geordnete Einbau niedermolekularer Verbindungen in das Kristallgitter von Proteinen (auf Gitterplätze zwischen den Proteinen) ist beschrieben. In Kristallen von Rattentrypsinvarianten bilden Benzamidinmoleküle Kristallkontakte in Oberflächenbereichen, die nicht als typische Binderegionen gelten können (Reyda *et al.*, 2003; Wilke *et al.*, 1991). Es ist verständlich, dass derartige Situationen zu erheblichen Fehlinterpretationen führen, wenn strukturelle Informationen in das Wirkstoffdesign ohne eine vorherige genaue Analyse der Datenlage einfließen. Die Frage, wie ein Rezeptor seinen Liganden sieht, muss um die Frage, wie der Ligand seinen Rezeptor sieht und verändert, erweitert werden. Es handelt sich hier um

einen wechselseitigen Erkennungsprozess zwei gleichwertiger Partner.

Die Wissenschaft ist heute noch weit davon entfernt, aus den vier kodierenden Basen der Genome, die dreidimensionale Struktur der Genprodukte vorherzusagen, für die sie kodieren. Verfügbare Strukturdaten – ob aus NMR-Experimenten, aus Röntgenkristallstrukturen oder aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Einzelpartikeln und 2-dimensionalen Kristallen – werden das Augenmerk der Wirkstoffforscher weg vom blinden Durchmustern großer Substanzbibliotheken hin zum rationalen Design führen. Jedoch brauchen solche experimentellen Ansätze immer noch zuviel Zeit. Proteine müssen kloniert, exprimiert, gereinigt und geeignete Bedingungen für deren Kristallisation gefunden werden. Obwohl Zeit Geld bedeutet und beide knapp sind, konzentrieren wir uns auf die pharmazeutisch-medizinischen Herausforderungen der Zukunft, Therapiekonzepte zu verbessern, ohne dass dies automatisch mit einem Anstieg des Ressourceneinsatzes parallel läuft. Es stellt sich nämlich die Frage, ob dieser schon aus rein ökonomischen Gründen geleistet werden kann.

Für das rationale Wirkstoffdesign ist der limitierende Faktor derzeit das Verständnis der physikochemischen Eigenschaften der Protein-Ligand-Wechselwirkungen auf atomarer Ebene. Wir haben mit dem hier vorgestellten experimentellen Ansatz zeigen können, dass die Beziehung zwischen Struktur und Affinität wesentlich komplexer ist als anfänglich angenommen. **Abb. 4-1** zeigt die Röntgenkristallstrukturen des von der Firma Astra-Zeneca entwickelten, potenten Faktor Xa Inhibitor (Zeneca) aus **Tabelle 1-4** (Seite 24) im Komplex mit **X(triple.Glu)bT (A)** und **X(triple)rT (B)**, einer Struktur des Faktor Xa, in die der Ligand auf dem Computer eingepasst wurde **(C)**, sowie die experimentell ermittelten *K*-Werte (μM). Alle drei Proteine präsentieren eine weitgehend ähnliche Struktur, dennoch zeigen die kinetischen Daten deutlich unterschiedliche Affinitäten.

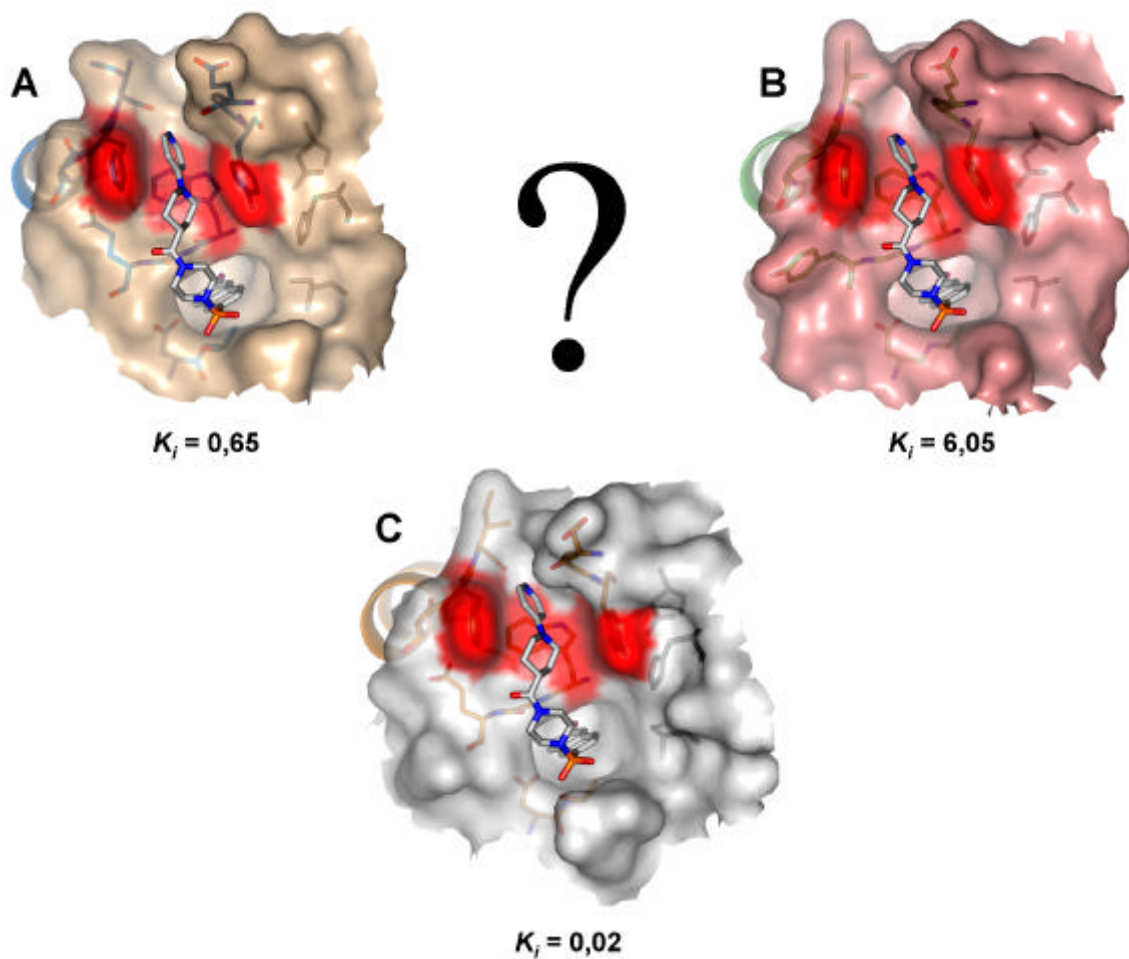


Abb. 4-1 Komplexstrukturen der beiden Varianten **X(triple.Glu)bT (A)** und **X(triple)rT (B)** in der *up*-Konformation sowie die Struktur des Faktor Xa mit eingepasstem Liganden **(C)**. Die Aminosäuren der hydrophoben Aromatentasche sind **rot** hinterlegt. Die drei Aminosäuren der katalytischen Triade (His, Asp und Ser rechts von der Bindetasche) sind **grau** eingefärbt.

Basierend auf diesen drei Strukturen lassen sich die Diskrepanzen in den Affinitäten nicht erklären. Welcher K_i -Wert passt zu welcher Struktur? Erst die Betrachtung der in **Abb. 4-2** gezeigten Strukturen der vergleichbaren Rattentrypsin- **(B)** und Rindertrypsin- **(A)** Varianten mit anderen Verläufen der 175-Schleife **(C)** demonstrieren die hohe Flexibilität und Adaptionfähigkeit innerhalb dieses Bereichs und lassen uns erahnen, welche strukturellen Veränderungen bei der Annäherung von Protein und Ligand ablaufen und in Hinblick auf die Bindungskinetik so unterschiedliche Eigenschaften bedingen.

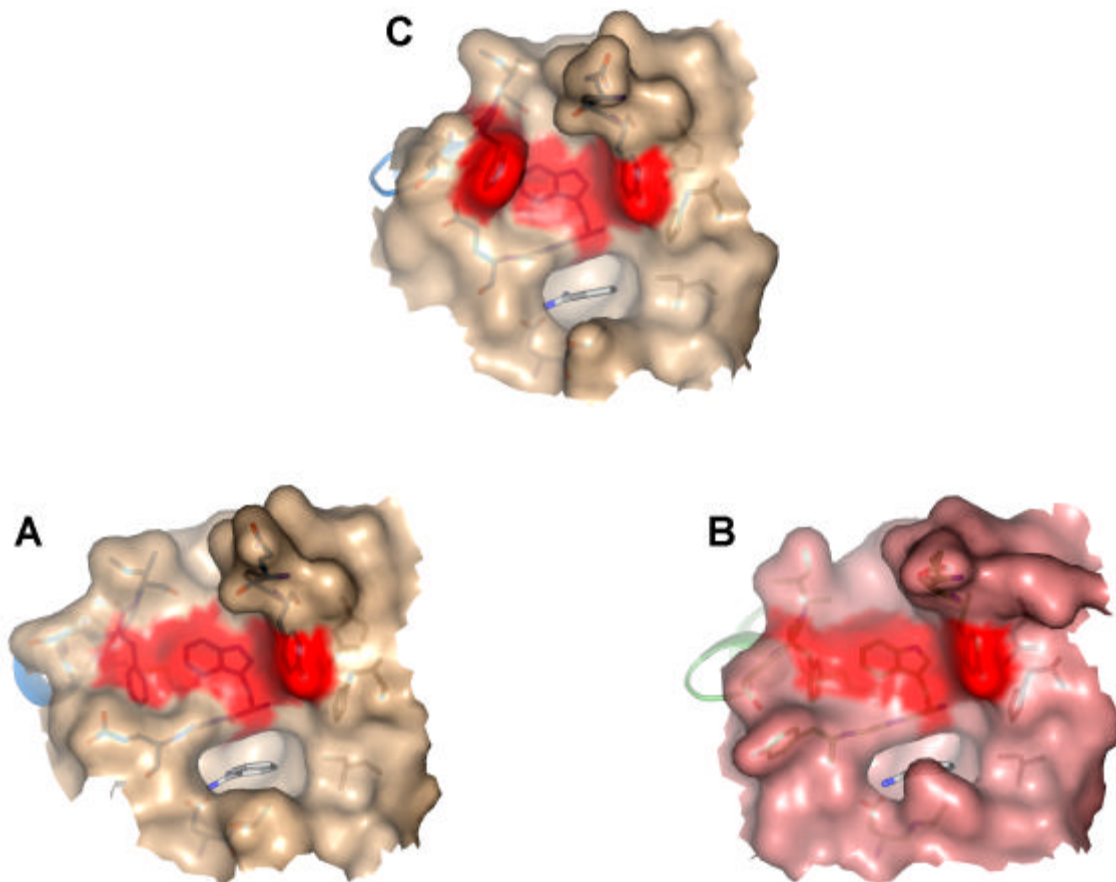


Abb. 4-2 Komplexstrukturen der **X(triple.Glu)bT**-Variante in der *down*-Konformation (**A**) und in der *super-up*-Konformation (**C**) sowie die **X(triple)rT**-Variante (**B**) in der *down*-Konformation.

Selbst geringe Unterschiede führen dazu, dass die generierten Varianten einen andersartigen strukturellen Phänotyp mit abweichenden kinetischen Eigenschaften zeigen. Betrachten wir nochmals die Ergebnisse von Reyda *et al.* und vergleichen sie mit den hier vorgestellten Ergebnissen, so erkennen wir zwischen den nativen Formen des Rattentrypsins und des Rindertrypsins keine signifikanten Unterschiede. Beides sind Trypsine, die Substrate mit ähnlicher Kinetik spalten und durch dieselben Inhibitoren ähnlich affin gehemmt werden. Erstaunlich ist hingegen, wie unterschiedlich sich beide Enzyme verhalten, wenn ihnen die Bindetasche des Faktor Xa eingeführt wird. Dass weder Schleifenverläufe noch die 3D-Struktur eines Proteins einfach aus dessen Primärstruktur ableitbar sind, zeigt das nach wie vor aus Sicht der Theorie ungelöste Problem der Proteinfaltungsvorhersage aus der Sequenz (Dinner *et al.*, 2000).

Die strukturellen Untersuchungen anhand des bisbenzamidischen Inhibitors (ST353) (Abschnitt 3.2, Seite 39) haben die Problematik multipler Konformationen einschließlich der Licht und strukturinduzierten Umlagerung einer Doppelbindungs-Konfiguration in der Bindetasche verdeutlicht. Welchen Einfluss die Wahl der experimentellen Kristallisationsmethode (Kokristallisation bzw. Diffusionsmethode) auf das Erscheinungsbild des Liganden im Komplex mit dem Protein haben kann, konnte ebenfalls an diesem Beispiel gezeigt werden (Rauh *et al.*, 2003).

Sicherlich hat die Evolution Proteine nicht nur gemäß Funktion und Aktivität optimiert, sondern auch hinsichtlich ihrer Faltung. Unsere Eingriffe durch Mutagenese haben möglicherweise dieses stabile Gefüge gestört. Die interessanten Effekte, die wir durch das bislang für dieses Beispiel einwenig geöffnete Blickfenster der Strukturbiologie beobachten können, unterstreichen in beeindruckender Weise die immense Komplexität der Natur. Die, betrachtet auf die Hemmaktivität des Faktor Xa, sonst ernüchternden Ergebnisse der gezielten Mutation konnten durch die Strukturdaten erklärt werden und brachten neue Erkenntnisse. Weiterhin konnten wir zeigen, dass Aminosäuren, die nicht unmittelbar in die Bindetasche des Proteins hineinragen und somit keine direkten Wechselwirkungen mit dem Liganden eingehen, dennoch einen dramatischen Effekt auf die Struktur des Proteins sowie die Affinität des Liganden haben können. Dies ließ sich anhand der Trypsinvarianten mit einem Glutamat in Position 217 demonstrieren.

Mit dem hier vorgestellten, auf der Serinprotease Trypsin basierenden System haben wir heute ein sehr vielschichtiges Untersuchungsobjekt für grundlegende Betrachtungen in den Händen. Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese können zeitsparend neue Trypsinvarianten produziert werden. Die relativ großen Mengen an Protein, die mit den Methoden der Renaturierung erhalten wird, ermöglichen uns zukünftig, neben weiteren strukturellen Charakterisierungen auch mikrokalorimetrische Messungen zur Erforschung der Thermodynamik von Bindungsprozessen einzusetzen. Auch ist der Einsatz von NMR-Methoden für die Analyse der dynamischen Anpassungen der 175-Schleife der Trypsinvarianten geplant. Das etablierte Expressionssystem sollte eine Vollmarkierung erlauben. Die Bedeutung einzelner Aminosäuren oder ganzer Schleifen am Bindungsgeschehen können so mit gewünschter Präzision auf atomarer Ebene studiert werden.

Fragen der Affinität und Selektivität sind entscheidende aber bisher nur oberflächlich verstandene Aspekte des modernen Wirkstoffdesigns. Mit unserem einfachen System konnten wir die Grenzen des derzeit Machbaren demonstrieren. Die Kombination aus

strukturellen und thermodynamischen Experimenten sollten die fehlenden Hinweise erklären, mit denen es gelingen könnte, eine leistungsfähige Vorhersage zu treffen. Erst das genaue Verständnis auf atomarer Ebene wird es uns erlauben, die computerbasierten Ansätze der Wirkstoffforschung signifikant voranzutreiben. Der Wunsch des Pharmaforschers, wichtige Aspekte der Selektivität und Affinität bereits frühzeitig *in silico* zu simulieren und erst im letzten Schritt den zeit- und kostenintensiven Weg in die chemischen Syntheselabors zu wagen, wird dann als hochgestecktes Ziel hoffentlich besser erfüllbar sein.

Letztendlich wird erst die Gesamtbetrachtung aller diskutierter Teilaspekte in einem Dialog resultieren, der uns das *Puzzle* um das Verständnis von Selektivität und Spezifität lösen lässt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein leistungsfähiges Expressions- und Rückfaltungssystem für die Produktion rekombinanten Rindertrypsins zu etablieren und Proteinmengen von 5 bis 15 mg pro Trypsinvariante im Labormaßstab bei relativ geringen Kosten zu erhalten.

Mit Hilfe dieses Systems und der verwendeten zielgerichteten Mutagenese konnte die Bindetasche der trypsinähnlichen Serinprotease Faktor Xa sukzessive auf Trypsin übertragen werden. Vierzehn bovine Trypsinvarianten wurden mit den vorgestellten Methoden kloniert, exprimiert, renaturiert und mit Enterokinase zu biologisch aktiven Enzym umgesetzt. Jede der Varianten konnte kinetisch und strukturell im Komplex mit mehreren, in ihren Strukturen z.T. sehr diversen Inhibitoren charakterisiert werden. Mittels der Methode des Molekularen Ersatzes konnten Röntgenkristallstrukturen von Trypsinvarianten in zwei neuen Raumgruppen gelöst werden. Insgesamt sind im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich die Raumstrukturen von über 44 Trypsin- bzw. mutagenisierten Trypsin-Varianten mit Liganden vermessen und aufgeklärt worden.

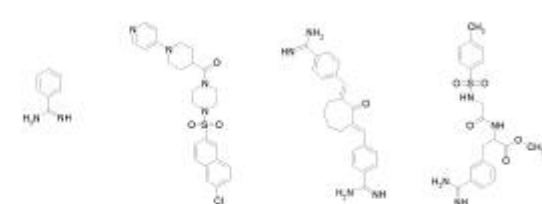
Tabelle 5-1 Tabelle der in dieser Arbeit röntgenkristallographisch vermessenen Komplexstrukturen. In Spalte **Ref.** finden sich Verweise zu den entsprechenden Abschnitten.

Struktur	Ligand	Raumgruppe	Zellkonstanten			Aufl. (Å)	rms deviation		R _{int}	R _{free}	Ref.
			a(Å)	b(Å)	c(Å)		angle	bond			
bovineTrypsin	Aprotinin-Arg15	I222	75.78	85.24	122.65	1.70	0.005	1.298	20.9	22.6	(3.4)
bovineTrypsin	ST353	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	62.98	69.52	63.88	1.70	0.005	1.310	17.5	19.6	(3.2)
bovineTrypsin	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.49	69.06	63.78	1.50	0.005	1.321	19.1	--	
bovineTrypsin	Zeneca (pH 7)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.46	69.02	63.67	2.00	0.005	1.322	18.3	--	
bovineTrypsin	Zeneca (pH 8)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.13	69.15	63.89	1.80	0.005	1.346	18.7	--	
X(99)bT	Aprotinin-Arg15	I222	75.77	85.40	122.80	2.20	0.006	1.322	20.1	22.8	(3.4)
X(99)bT	Benzamidin	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.46	69.08	63.78	1.80	0.005	1.323	19.8	21.5	
X(99)bT	ST353	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.83	69.37	62.99	2.00	0.006	1.324	19.7	22.2	
X(99)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.46	69.02	63.67	2.00	0.005	1.347	18.3	--	
X(99)bT	Zeneca	I213	122.97	122.97	122.97	3.00	0.005	1.324	20.1	--	
X(190)bT	Benzamidin	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.58	69.02	63.86	1.70	0.005	1.287	18.3	--	
X(190)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.45	69.06	63.93	1.80	0.005	1.312	19.1	--	
X(190)bT	Zeneca	P3121	55.19	55.19	109.56	2.00	0.005	1.322	20.1	--	
X(99/A190)bT	Benzamidin	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.58	69.07	63.34	2.30	0.008	2.107	19.4	--	(3.1)
X(99/A190)bT	ST353	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.83	69.26	63.14	2.00	0.005	1.347	18.7	21.2	(3.2)
X(99/A190)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.40	69.31	63.64	2.00	0.005	1.310	18.5	--	
X(99/A190)bT	Zeneca	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	63.01	68.98	63.67	2.40	0.009	1.911	21.3	--	(3.1)
X(SSFI)bT	Aprotinin-Arg15	P22 ₁ 2 ₁	76.15	82.87	119.74	1.70	0.005	1.330	21.3	23.7	(3.4)
X(SSFI)bT	Benzamidin	P3 ₁ 21	54.94	54.94	110.34	1.90	0.005	1.401	18.5	--	
X(SSFI)bT	ST353	P3 ₁ 21	55.03	55.03	109.76	1.80	0.005	1.295	19.7	22.2	
X(SSFI)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.08	58.09	68.54	1.42	0.005	1.321	16.2	18.5	
X(99/174)bT	Benzamidin	P3 ₁ 21	55.02	55.02	109.96	1.80	0.005	1.351	18.3	--	
X(99/174)bT	ST353	P3 ₁ 21	55.18	55.18	111.22	2.00	0.006	1.334	19.3	24.4	
X(99/174)bT	ST800	P3 ₁ 21	54.99	54.99	110.20	1.80	0.005	1.343	16.6	21.8	
X(174/190)bT	Benzamidin	P3 ₁ 21	55.00	55.00	109.53	1.90	0.005	1.324	18.2	--	
X(174/190)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.17	57.88	68.53	1.65	0.005	1.343	19.6	21.8	
X(174/190)bT	Zeneca	P3 ₁ 21	55.08	58.07	68.09	1.65	0.005	1.324	18.3	20.4	
X(Triple)bT	Benzamidin	P3 ₁ 21	54.94	54.94	110.14	2.00	0.005	1.270	18.4	20.3	
X(Triple)bT	ST353	P3 ₁ 21	55.24	55.24	111.28	1.80	0.005	1.350	17.3	19.6	(3.2)
X(Triple)bT	ST800	P3 ₁ 21	54.97	54.97	109.89	1.42	0.005	1.328	18.5	19.8	
X(SSYI)bT	ST800	P3 ₁ 21	55.08	55.08	109.75	1.92	0.006	1.317	21.2	25.4	(3.3)
X(SSYI)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.11	58.02	68.52	1.62	0.005	1.357	18.6	19.6	(3.3)
X(SSWI)bT	Aprotinin-Arg15	I222	75.78	85.59	122.72	2.00	0.005	1.267	18.2	21.6	(3.4)
X(SSWI)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.05	55.97	68.53	2.30	0.006	1.317	18.6	22.2	(3.3)
X(SSAI)bT	Benzamidin	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	61.63	70.58	64.13	1.80	0.006	1.305	22.2	24.9	(3.3)
X(SSAI)bT	Benzamidin	P3 ₁ 21	54.55	54.55	136.80	1.80	0.006	1.353	18.9	22.5	(3.3)
X(SSAI)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.10	58.21	68.04	1.75	0.005	1.317	18.6	23.3	(3.3)
X(SSRI)bT	Benzamidin	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	61.10	70.34	64.15	1.80	0.005	1.320	21.6	24.1	(3.3)
X(SSRI)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.10	57.78	67.46	1.70	0.005	1.343	19.8	23.0	(3.3)
X(SSFI.Glu)bT	Benzamidin	P3 ₁ 21	54.58	54.58	136.62	1.72	0.006	1.351	21.0	23.6	(3.3)
X(SSFI.Glu)bT	ST800	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	55.13	58.24	67.81	1.90	0.005	1.342	19.5	21.7	(3.3)
X(Triple.Glu)bT	Benzamidin	P3 ₁ 21	54.93	54.93	108.41	1.65	0.005	1.283	21.3	23.6	(3.3)
X(Triple.Glu)bT	Benzamidin	P3 ₁ 21	54.68	54.68	136.46	1.60	0.004	1.342	19.0	20.0	(3.3)
X(Triple.Glu)bT	Zeneca	P3 ₁ 21	54.75	54.75	144.07	2.00	0.005	1.300	19.1	22.2	(3.3)

Stand am Anfang der Arbeit das Vorhaben, Bindetaschen strukturell nicht charakterisierter Rezeptoren für das strukturbasierte Wirkstoffdesign auf verwandte Proteine zu übertragen, so konnten am Ende der Arbeit durch die große Anzahl an Röntgenkristallstrukturen und kinetischen Daten die Fragestellung in Richtung des Verständnis physikochemischer Zusammenhänge von Protein-Ligand-Wechselwirkungen, besonders im Hinblick auf die Charakterisierung selektivitätsbestimmender Faktoren und Fragen der Proteinflexibilität in Bindetaschen, erweitert werden.

Die zunächst eingeführten Variationen im Bereich der 99- und 190-Schleife resultierten strukturell und kinetisch in einem Trend hin zu Faktor Xa. Die kinetische Untersuchung der Substratspezifität mit Peptidbibliotheken unterstreicht die zunehmende Präferenz von Arg und Gly in den Positionen P1 und P2. Das Einführen der *Ser-Ser-Phe-Ile*-Sequenz in die 175-Schleife setzt diesen Trend nicht in der erwartenden Weise fort, sondern zeigt im Vergleich zu den Inhibitionswerten gegenüber Trypsin keine signifikanten Unterschiede. Die strukturelle Charakterisierung präsentiert die eingeführte 175-Schleife in einer unerwarteten Orientierung, der *down*-Konformation. Der Teil der Bindetasche, die sogenannte „*hydrophobe-aromatische Box*“, die für die Adressierung durch Faktor Xa-spezifische Inhibitoren essentiell ist, wurde wiedererwartend nicht voll ausgebildet.

Tabelle 5-2 Tabelle der K_i -Werte der in dieser Arbeit behandelten bovinen Trypsinvarianten (**bT**) und Serinprotease-Inhibitoren, sowie der Rattentrypsinvarianten (**rT**) (Reyda *et al.*, 2003).

Ki-values [μ M]				
	(1)	(2)	(3)	(4)
bovine trypsin	39	13.40	0.40	4.37
X(99)bT ^a	36	2.30	0.70	7.15
X(190)bT ^b	34	8.03	0.30	7.60
X(190/99)bT ^{a,b}	53	0.85	0.90	12.00
X(SSFI)bT ^c	79	15.19	0.48	21.04
X(99/174)bT ^{a,c}	79	2.45	1.40	21.40
X(190/174)bT ^{b,c}	81	8.15	0.91	15.10
X(99/190/174)bT ^{a,b,c}	69	1.95	1.25	22.10
rat trypsin	7	26.00	0.12	
X(99)rT ^d	32	4.45	0.054	
X(triple)rT ^{b,d,e}	143	6.05	0.025	
X(SSYI)bT	55	19.44	0.34	18.45
X(SSWI)bT	306	11.96	0.57	73.62
X(SSAI)bT	427	97.12	0.92	97.79
X(SSRI)bT	566	> 1000	21.98	278.96
X(SSFI.Glu)bT	68	4.57	0.057	19.56
X(triple.Glu)bT	51	0.65	0.049	31.55
factor Xa	160	0.02	0.025	0.84

^a Contains the mutation (Asp97, Leu99) \rightarrow (Gln97, Tyr99)

^b Contains the mutation (Ser190) \rightarrow (Ala190)

^c Contains the mutation (Tyr172, Pro173, Gly174, Glu175) \rightarrow (Ser172, Ser173, Phe174, Ile175)

^d Contains the mutation (Gln97, Leu99) \rightarrow (Gln97, Tyr99)

^e Contains the mutation (Tyr172, Pro173, Gly174, Leu175) \rightarrow (Ser172, Ser173, Phe174, Ile175)

Zur genaueren Charakterisierung wurden vier weitere Variationen in Position 174 der bereits veränderten 175-Schleife eingeführt. In Abhängigkeit von den verwendeten Kristallisationsbedingungen und den erhaltenen Packungsmustern sowie den gebundenen Liganden wurde neben der *down*- und *up*-Konformation noch eine dritte, die *super-up*-Konformation, gefunden. Anhand der nachgewiesenen strukturellen Plastizität dieses Bereiches kann das extrem unterschiedliche kinetische Verhalten der Trypsin-Varianten mit modifizierter 175-Schleife erklärt werden.

In zwei abschließenden Mutationsstudien wurde Ser217 (Trypsin) durch Glu217 (Faktor Xa) in den Trypsinvarianten **X(SSFI)bT** und **X(triple)bT** ersetzt. Neben den beschriebenen Abhängigkeiten der Konformationen der 175-Schleife von der Kristallpackung und dem gebundenen Ligand, zeigen beide Glu217-Varianten einen deutlichen Sprung in ihrem kinetischen Verhalten hin zu Faktor Xa. Als eine der entscheidenden Strukturen zeigt der Komplex aus **X(triple.Glu)bT** und der Zeneca-Verbindung (**Tabelle 1-4**) die weitgehende Analogie der Bindetasche dieser Variante im Vergleich zu der Bindetasche von Faktor Xa. Das Ziel, die Bindetasche von Faktor Xa auf das verwandte Enzym Trypsin zu übertragen, wurde somit strukturell erreicht.

Trotz dieser strukturellen Übereinstimmungen bleibt unter den enzymkinetisch charakterisierten Inhibitoren zumindest für die Faktor Xa selektive Zeneca-Verbindung eine Diskrepanz von einer Größenordnung. Für dieses Beispiel helfen jedoch die mannigfachen Röntgenkristallstrukturen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt wurden, diese Diskrepanz zwischen dem *Target*-Protein Faktor Xa, der Rattentrypsinvariante **X(triple)rT** und den beiden Rindertrypsinvarianten **X(triple)bT**, **X(triple.Glu)bT** durch ein Mehrstufen-Modell als Beiträge für die strukturelle Adaption der Bindetasche aufzubringende Energie zu erklären.

Das Bild einer einzelnen Komplexstruktur reflektiert in den gezeigten Beispielen nur ungenügend die Vorgänge, die durch Bindung des Inhibitors in der Bindetasche zur Hemmung der Enzymaktivität führen und verdeutlicht die aktuellen Herausforderungen im Bereich des strukturbasierten Wirkstoffdesigns. Die etablierten Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit bilden eine solide Grundlage für die unbedingt erforderliche Erforschung selektivitäts- und spezifitätsbestimmender Faktoren an der Schnittstelle zwischen Rezeptor und Ligand.

6 Anhang

Aus der vorliegenden Arbeit sind, folgende Beiträge hervorgegangen:

Publikationen in schriftlicher Form

- Daniel Rauh, Sabine Reyda, Gerhard Klebe and Milton T. Stubbs (2002), *Trypsin Mutants for Structure-Based Drug Design: Expression, Refolding and Crystallisation*, Biol. Chem., Vol. 383 (7), 1309-1314
- Daniel Rauh, Gerhard Klebe, Jörg Stürzebecher and Milton T. Stubbs, *ZZ made EZ: Influence of inhibitor configuration on enzyme selectivity*, J. Mol. Biol., eingereicht
- Daniel Rauh, Gerhard Klebe and Milton T. Stubbs, *Understanding protein-ligand interactions: Role of protein plasticity*, eingereicht

Vorträge

- Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G., Stubbs, M.T., *Trypsin mutants for structure-based inhibitor design: A feasibility study using Factor Xa*, Symposium des Graduiertenkollegs "Proteinfunktion auf atomarer Ebene" 2000, Rauschholzhausen
- Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G., Stubbs, M.T., *Trypsin mutants for structure based inhibitor design: A feasibility study using Factor Xa*, 19th Winter School on Proteinases and their Inhibitors Recent Developments 2001, Tiers Südtirol
- Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G., Stubbs, M.T., *Engineering trypsin mutants for structure-based drug design: Expression, folding, crystallographic and kinetic characterisation*, DFG Begutachtung des Graduiertenkollegs "Proteinfunktion auf atomarer Ebene" 2001, Marburg
- Rauh, D., Klebe, G., Stubbs, M.T., *Trypsin mutants for structure-based drug design – the story so far ...*, Genomics Institute of the Novartis Foundation (2002), La Jolla, USA
- Rauh, D., Klebe, G., Stubbs, M.T., *Trypsin mutants for structure-based inhibitor design: Expression, folding, crystallographic and kinetic characterisation*, Gemeinsame Jahrestagung der GDCh und DPhG 2002, Travemünde

Poster

- Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G., Stubbs, M.T., *Strukturbasiertes Wirkstoffdesign mit Hilfe von Trypsinmutanten am Beispiel von Faktor Xa*, DPhG Jahrestagung 2001, Halle/Saale
- Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G., Stubbs, M.T., *Engineering trypsin mutants for structure-based drug design: Expression, folding, crystallographic and kinetic characterisation*, 2nd General Meeting of the International Proteolysis Society, 2001, München

7 Literaturverzeichnis

- Abrahmsen, L., Tom, J., Burnier, J., Butcher, K. A., Kossiakoff, A. & Wells, J. A. (1991). Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution. *Biochemistry* **30**(17), 4151-9.
- Adler, M., Davey, D. D., Phillips, G. B., Kim, S. H., Jancarik, J., Rumennik, G., Light, D. R. & Whitlow, M. (2000). Preparation, characterization, and the crystal structure of the inhibitor ZK-807834 (CI-1031) complexed with factor Xa. *Biochemistry* **39**(41), 12534-42.
- Auterhoff, H., Knabe, J. & Hölftje, H. D. (1994). *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Backes, B. J., Harris, J. L., Leonetti, F., Craik, C. S. & Ellman, J. A. (2000). Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin. *Nat Biotechnol* **18**(2), 187-93.
- Barrios, A. M. & Craik, C. S. (2002). Scanning the prime-Site substrate specificity of proteolytic enzymes: A novel assay based on ligand-Enhanced lanthanide ion fluorescence. *Bioorg Med Chem Lett* **12**(24), 3619-23.
- Belshaw, P. J., Schoepfer, J. G., Liu, K. Q., Morrison, K. L. & Schreiber, S. L. (1995). Rational Design of Orthogonal Receptor - Ligand Combinations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**(19), 2129-2132.
- Bishop, A. C., Kung, C. Y., Shah, K., Witucki, L. & Shokat, K. M. (1999). Generation of monospecific nanomolar tyrosine kinase inhibitors via a chemical genetic approach. *JACS* **121**, 627-631.
- Bishop, A. C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C. & Shokat, K. M. (1998). Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr Biol* **8**(5), 257-66.
- Bishop, A. C. & Shokat, K. M. (1999). Acquisition of inhibitor-sensitive protein kinases through protein design. *Pharmacol Ther* **82**(2-3), 337-46.
- Blundell, T. L. & Mizuguchi, K. (2000). Structural genomics: an overview. *Prog Biophys Mol Biol* **73**(5), 289-95.
- Bode, W. (1979). [Activation, activity and inhibition of bovine trypsin]. *Naturwissenschaften* **66**(5), 251-8.

- Bode, W., Brandstetter, H., Mather, T. & Stubbs, M. T. (1997). Comparative analysis of haemostatic proteinases: structural aspects of thrombin, factor Xa, factor IXa and protein C. *Thromb Haemost* **78**(1), 501-11.
- Bode, W., Meyer, E., Jr. & Powers, J. C. (1989). Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* **28**(5), 1951-63.
- Böhm, H. J. & Klebe, G. (1996). What can we learn from molecular recognition in protein-ligand complexes for the design of new drugs? *Angew. Chem. int. Ed. Engl.* **35**, 2566-2587.
- Böhm, H.-J., Klebe, G. & Kubinyi, H. (1996). *Wirkstoffdesign*. Spektrum Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Böhm, M., Stürzebecher, J. & Klebe, G. (1999). Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analyses using comparative molecular field analysis and comparative molecular similarity indices analysis to elucidate selectivity differences of inhibitors binding to trypsin, thrombin, and factor Xa. *J Med Chem* **42**(3), 458-77.
- Brandstetter, H., Kuhne, A., Bode, W., Huber, R., von der Saal, W., Wirthensohn, K. & Engh, R. A. (1996). X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. Implications for drug design and substrate recognition. *J Biol Chem* **271**(47), 29988-92.
- Brünger, A. (1992). X-PLOR (Version 3.1). A System for X-ray Crystallography and NMR. *Yale University Press: New Haven, CT*.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**(Pt 5), 905-21.
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A. & Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**(6652), 753-8.
- Butenas, S., DiLorenzo, M. E. & Mann, K. G. (1997). Ultrasensitive fluorogenic substrates for serine proteases. *Thromb Haemost* **78**(4), 1193-201.
- Carr, R. & Jhoti, H. (2002). Structure-based screening of low-affinity compounds. *Drug Discov Today* **7**(9), 522-527.

-
- Carter, P. & Wells, J. A. (1987). Engineering enzyme specificity by "substrate-assisted catalysis". *Science* **237**(4813), 394-9.
- Celis, J. E., Kruhoffer, M., Gromova, I., Frederiksen, C., Ostergaard, M., Thykjaer, T., Gromov, P., Yu, J., Palsdottir, H., Magnusson, N. & Orntoft, T. F. (2000). Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS* **480**(1)(25), 2-16.
- ChemBioChem. (2002). Special Issue: G-Protein-Coupled Receptors. *ChemBioChem* **3**(10).
- Clark, D. E. & Pickett, S. D. (2000). Computational methods for the prediction of 'drug-likeness'. *Drug Discov Today* **5**(2), 49-58.
- Connelly, P. R. (1994). Acquisition and use of calorimetric data for prediction of the thermodynamics of ligand-binding and folding reactions of proteins. *Curr Opin Biotechnol* **5**(4), 381-8.
- Davie, E. W., Fujikawa, K. & Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30**(43), 10363-70.
- Davies, T. G., Hubbard, R. E. & Tame, J. R. (1999). Relating structure to thermodynamics: the crystal structures and binding affinity of eight OppA-peptide complexes. *Protein Sci* **8**(7), 1432-44.
- Davis, A. & Teague, S. (1999). Hydrogen Bonding, Hydrophobic Interactions, and Failure of the Rigid Receptor Hypothesis. *Angw Chem Int Ed Engl* **38**(6), 736-749.
- DeLano, W. L. (2002). The PyMOL molecular graphics system (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA., , USA.
- Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D. & Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli. *Science* **262**(5140), 1744-7.
- Dinner, A. R., Sali, A., Smith, L. J., Dobson, C. M. & Karplus, M. (2000). Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci* **25**(7), 331-9.
- Dixon, M. (1972). The graphical determination of K_m and K_i . *Biochem J* **129**(1), 197-202.
- Dixon, S. L. & Villar, H. O. (1998). Bioactive diversity and screening library selection via affinity fingerprinting. *J Chem Inf Comput Sci* **38**(6), 1192-203.
- Drews, J. (2000). Drug discovery: a historical perspective. *Science* **287**(5460), 1960-4.

- Drews, J. & Ryser, S. (1997). The role of innovation in drug development. *Nat Biotechnol* **15**(13), 1318-9.
- Dry, S., McCarthy, S. & Harris, T. (2000). Structural genomics in the biotechnology sector. *Nat Struct Biol* **7 Suppl**, 946-9.
- Dullweber, F. (2000). Strukturelle und physikochemische Charakterisierung der Protein-Ligand-Wechselwirkung am Beispiel der Serinproteasen Thrombin und Trypsin. *Dissertation, Philipps-Universität Marburg*.
- Dullweber, F., Stubbs, M. T., Musil, D., Stürzebecher, J. & Klebe, G. (2001). Factorising ligand affinity: a combined thermodynamic and crystallographic study of trypsin and thrombin inhibition. *J Mol Biol* **313**(3), 593-614.
- Dunitz, J. D. (1995). Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem Biol* **2**(11), 709-12.
- Engh, R. A., Brandstetter, H., Sucher, G., Eichinger, A., Baumann, U., Bode, W., Huber, R., Poll, T., Rudolph, R. & von der Saal, W. (1996). Enzyme flexibility, solvent and 'weak' interactions characterize thrombin-ligand interactions: implications for drug design. *Structure* **4**(11), 1353-62.
- Fersht, A. R. (1972). Conformational equilibria in chymotrypsin. The energetics and importance of the salt bridge. *J Mol Biol* **64**(2), 497-509.
- Fitzgerald, P. M. & Springer, J. P. (1991). Structure and function of retroviral proteases. *Annu Rev Biophys Chem* **20**, 299-320.
- Gabriel, B., Stubbs, M. T., Bergner, A., Hauptmann, J., Bode, W., Stürzebecher, J. & Moroder, L. (1998). Design of benzamidine-type inhibitors of factor Xa. *J Med Chem* **41**(22), 4240-50.
- Gohlke, H. & Klebe, G. (2002). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**(15), 2644-76.
- Graf, L., Craik, C. S., Patthy, A., Rocznik, S., Fletterick, R. J. & Rutter, W. J. (1987). Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry* **26**(9), 2616-23.
- Gupta, P., Hall, C. K. & Voegler, A. C. (1998). Effect of denaturant and protein concentrations upon protein refolding and aggregation: a simple lattice model. *Protein Science* **7**(12), 2642-2652.
- Harris, J. L., Alper, P. B., Li, J., Rechsteiner, M. & Backes, B. J. (2001). Substrate specificity of the human proteasome. *Chem Biol* **8**(12), 1131-41.

-
- Harris, J. L., Backes, B. J., Leonetti, F., Mahrus, S., Ellman, J. A. & Craik, C. S. (2000). Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14), 7754-9.
- Harris, J. L., Peterson, E. P., Hudig, D., Thornberry, N. A. & Craik, C. S. (1998). Definition and redesign of the extended substrate specificity of granzyme B. *J Biol Chem* **273**(42), 27364-73.
- Hauptmann, J. & Stürzebecher, J. (1999). Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: from bench to bedside. *Thromb Res* **93**(5), 203-41.
- Hedstrom, L., Lin, T. Y. & Fast, W. (1996). Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. *Biochemistry* **35**(14), 4515-23.
- Hedstrom, L., Szilagyi, L. & Rutter, W. J. (1992). Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science* **255**(5049), 1249-53.
- Heinemann, U., Frevert, J., Hofmann, K., Illing, G., Maurer, C., Oschkinat, H. & Saenger, W. (2000). An integrated approach to structural genomics. *Prog Biophys Mol Biol* **73**(5), 347-62.
- Heinemann, U., Illing, G. & Oschkinat, H. (2001). High-throughput three-dimensional protein structure determination. *Curr Opin Biotechnol* **12**(4), 348-54.
- Hirsh, J. (1991a). Heparin. *N Engl J Med* **324**(22), 1565-74.
- Hirsh, J. (1991b). Oral anticoagulant drugs. *N Engl J Med* **324**(26), 1865-75.
- Hirsh, J. & Weitz, J. I. (1999). New antithrombotic agents. *Lancet* **353**(9162), 1431-6.
- Hoang, V. M., Foulk, R., Clauser, K., Burlingame, A. & Fisher, B. W. G. a. S. J. (2001). Functional proteomics: examining the effects of hypoxia on the cytotrophoblast protein repertoire. *Biochemistry* **40**(13), 4077-86.
- Hol, W. G. (2000). Structural genomics for science and society. *Nat Struct Biol* **7 Suppl**, 964-6.
- Hopfner, K. P., Brandstetter, H., Karcher, A., Kopetzki, E., Huber, R., Engh, R. A. & Bode, W. (1997). Converting blood coagulation factor IXa into factor Xa: dramatic increase in amidolytic activity identifies important active site determinants. *EMBO* **16**(22), 6626-35.
- Hopfner, K. P., Kopetzki, E., Kresse, G. B., Bode, W., Huber, R. & Engh, R. A. (1998). New enzyme lineages by subdomain shuffling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(17), 9813-8.

-
- Huber, R., Kukla, D., Ruhlmann, A., Epp, O. & Formanek, H. (1970). The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. I. Structure analysis and conformation of the polypeptide chain. *Naturwissenschaften* **57**(8), 389-92.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard. (1991). Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* **47**(Pt 2), 110-9.
- Kamata, K., Kawamoto, H., Honma, T., Iwama, T. & Kim, S. H. (1998). Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12), 6630-5.
- Khouri, H. E., Vernet, T., Menard, R., Parlati, F., Laflamme, P., Tessier, D. C., Gour-Salin, B., Thomas, D. Y. & Storer, A. C. (1991). Engineering of papain: selective alteration of substrate specificity by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **30**(37), 8929-36.
- Klabunde, T. & Hessler, G. (2002). Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem* **3**(10), 928-44.
- Koh, J. T. (2002). Engineering selectivity and discrimination into ligand-receptor interfaces. *Chem Biol* **9**(1), 17-23.
- Koonin, E. V., Wolf, Y. I. & Karev, G. P. (2002). The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature* **420**(6912), 218-23.
- Kridel, S. J., Chen, E., Kotra, L. P., Howard, E. W., Mobashery, S. & Smith, J. W. (2001). Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* **276**(23), 20572-8.
- Ladbury, J. E. & Chowdhry, B. Z. (1996). Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem Biol* **3**(10), 791-801.
- Lander, E. S. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**(6822), 860-921.
- Lesk, A. M. & Fordham, W. D. (1996). Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol* **258**(3), 501-37.
- Leung, D., Abbenante, G. & Fairlie, D. P. (2000). Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem* **43**(3), 305-41.
- Light, A., Duda, C. T., Odorzynski, T. W. & Moore, W. G. (1986). Refolding of serine proteinases. *J Cell Biochem* **31**(1), 19-26.
- Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **9**(5), 497-501.

- Link, E. M., Hardiman, G., Sluder, A. E., Johnson, C. D. & Liu, L. X. (2000). Therapeutic target discovery using *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacogenomics* **1**(2), 203-17.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **23**, 3-25.
- Mackman, R. L., Katz, B. A., Breitenbucher, J. G., Hui, H. C., Verner, E., Luong, C., Liu, L. & Sprengeler, P. A. (2001). Exploiting subsite S1 of trypsin-like serine proteases for selectivity: potent and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator. *J Med Chem* **44**(23), 3856-71.
- Maignan, S., Guilloteau, J.-P., Pouzieux, S., Choi-Sledeski, Y. M., Becker, M. R., Klein, S. I., Ewing, W. R., Pauls, H. W., Spada, A. P. & Mikol, V. (2000). Crystal structures of human factor Xa complexed with potent inhibitors. *J. Med. Chem.* **43**(17), 3226-3232.
- Marshall, T. H. & Akgun, A. (1971). The specificity of porcine elastase and -chymotrypsin. Effect of fatty acid chain length in a homologous series of nitrophenyl esters. *J Biol Chem* **246**(19), 6019-23.
- Mizuguchi, H., Hayashi, H., Okada, K., Miyahara, I., Hirotsu, K. & Kagamiyama, H. (2001). Strain is more important than electrostatic interaction in controlling the pKa of the catalytic group in aspartate aminotransferase. *Biochemistry* **40**(2), 353-60.
- Mole, J. E. & Horton, H. R. (1973). Kinetics of papain-catalyzed hydrolysis of -N-benzoyl-L-arginine-p- nitroanilide. *Biochemistry* **12**(5), 816-22.
- Mozhaev, V. V. & Martinek, K. (1981). The influence of effectors on the refolding (reactivation) of immobilized trypsin. *Eur J Biochem* **115**(1), 143-7.
- Mueller, M. M., Sperl, S., Stürzebecher, J., Bode, W. & Moroder, L. (2002). (R)-3-Amidinophenylalanine-derived inhibitors of factor Xa with a novel active-site binding mode. *Biol Chem* **383**(7-8), 1185-91.
- Nar, H., Bauer, M., Schmid, A., Stassen, J. M., Wienen, W., Priepke, H. W., Kauffmann, I. K., Ries, U. J. & Huel, N. H. (2001). Structural basis for inhibition promiscuity of dual specific thrombin and factor Xa blood coagulation inhibitors. *Structure (Camb)* **9**(1), 29-37.
- Nature Structural Biology. (2000). Supplement, Structural Genomics. *Nat Struct Biol.* **7**(Suppl).
- Navia, M. A. & Chaturvedi, P. R. (1996). Design principles for orally bioavailable drugs. *Drug Discovery Today* **1**(5), 179-189.

- Navia, M. A., Fitzgerald, P. M., McKeever, B. M., Leu, C. T., Heimbach, J. C., Herber, W. K., Sigal, I. S., Darke, P. L. & Springer, J. P. (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **337**(6208), 615-20.
- Ng, H. P., Buckman, B. O., Eagen, K. A., Guilford, W. J., Kochanny, M. J., Mohan, R., Shaw, K. J., Wu, S. C., Lentz, D., Liang, A., Trinh, L., Ho, E., Smith, D., Subramanyam, B., Vergona, R., Walters, J., White, K. A., Sullivan, M. E., Morrissey, M. M. & Phillips, G. B. (2002). Design, synthesis, and biological activity of novel factor Xa inhibitors: 4-aryloxy substituents of 2,6-diphenoxypyridines. *Bioorg Med Chem* **10**(3), 657-66.
- Nienaber, V. L., Davidson, D., Edalji, R., Giranda, V. L., Klinghofer, V., Henkin, J., Magdalinos, P., Mantei, R., Merrick, S., Severin, J. M., Smith, R. A., Stewart, K., Walter, K., Wang, J., Wendt, M., Weitzberg, M., Zhao, X. & Rockway, T. (2000a). Structure-directed discovery of potent non-peptidic inhibitors of human urokinase that access a novel binding subsite. *Structure Fold Des* **8**(5), 553-63.
- Nienaber, V. L., Richardson, P. L., Klighofer, V., Bouska, J. J., Giranda, V. L. & Greer, J. (2000b). Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening. *Nat Biotechnol* **18**(10), 1105-8.
- Nixon, A. E. (2002). Phage display as a tool for protease ligand discovery. *Curr Pharm Biotechnol* **3**(1), 1-12.
- Odorzynski, T. W. & Light, A. (1979). Refolding of the mixed disulfide of bovine trypsinogen and glutathione. *J Biol Chem* **254**(10), 4291-5.
- Ohtaka, H., Velazquez-Campoy, A., Xie, D. & Freire, E. (2002). Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: the binding thermodynamics of Amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of the HIV-1 protease. *Protein Sci* **11**(8), 1908-16.
- Ong, E. B. & Schollmann, G. (1966). [On the specificity of chymotrypsin and trypsin]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **344**(1), 13-5.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*. Macromolecular Crystallography, part A edit. Methods in Enzymology (C.W. Carter, J. R. M. S., Eds., Ed.), 276, Academic Press.
- Padmanabhan, K., Padmanabhan, K. P., Tulinsky, A., Park, C. H., Bode, W., Huber, R., Blankenship, D. T., Cardin, A. D. & Kisiel, W. (1993). Structure of human des(1-45) factor Xa at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* **232**(3), 947-66.

- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480), 739-45.
- Pandey, A. & Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**(6788)(15), 837-46.
- Papworth, C., Braman, J. & Wright, D. A. (1996). QuickChange site directed mutagenesis. *Strategies* **9**(3-4).
- Patrono, C. (1994). Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* **330**(18), 1287-94.
- Perona, J. J. & Craik, C. S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci* **4**(3), 337-60.
- Perona, J. J. & Craik, C. S. (1997). Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J Biol Chem* **272**(48), 29987-90.
- Perona, J. J., Tsu, C. A., McGrath, M. E., Craik, C. S. & Fletterick, R. J. (1993). Relocating a negative charge in the binding pocket of trypsin. *J Mol Biol* **230**(3), 934-49.
- Peterson, F. C., Gordon, N. C. & Gettins, P. G. (2001). High-level bacterial expression and ¹⁵N-alanine-labeling of bovine trypsin. Application to the study of trypsin-inhibitor complexes and trypsinogen activation by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **40**(21), 6275-83.
- Phillips, G., Guilford, W. J., Buckman, B. O., Davey, D. D., Eagen, K. A., Koovakkat, S., Liang, A., McCarrick, M., Mohan, R., Ng, H. P., Pinkerton, M., Subramanyam, B., Ho, E., Trinh, L., Whitlow, M., Wu, S., Xu, W. & Morrissey, M. M. (2002). Design, synthesis, and activity of a novel series of factor Xa inhibitors: optimization of arylamidine groups. *J Med Chem* **45**(12), 2484-93.
- Phillips, G. B., Buckman, B. O., Davey, D. D., Eagen, K. A., Guilford, W. J., Hinchman, J., Ho, E., Koovakkat, S., Liang, A., Light, D. R., Mohan, R., Ng, H. P., Post, J. M., Shaw, K. J., Smith, D., Subramanyam, B., Sullivan, M. E., Trinh, L., Vergona, R., Walters, J., White, K., Whitlow, M., Wu, S., Xu, W. & Morrissey, M. M. (1998). Discovery of N-[2-[5-[Amino(imino)methyl]-2-hydroxyphenoxy]-3, 5- difluoro-6-[3-(4, 5-dihydro-1-methyl-1H-imidazol-2-yl)phenoxy]pyridin-4-yl]-N-methylglycine (ZK-807834): a potent, selective, and orally active inhibitor of the blood coagulation enzyme factor Xa. *J Med Chem* **41**(19), 3557-62.

- Pinto, D. J., Orwat, M. J., Wang, S., Fevig, J. M., Quan, M. L., Amparo, E., Cacciola, J., Rossi, K. A., Alexander, R. S., Smallwood, A. M., Luetttgen, J. M., Liang, L., Aungst, B. J., Wright, M. R., Knabb, R. M., Wong, P. C., Wexler, R. R. & Lam, P. Y. (2001). Discovery of 1-[3-(aminomethyl)phenyl]-N-3-fluoro-2'-(methylsulfonyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl]-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (DPC423), a highly potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J Med Chem* **44**(4), 566-78.
- Prade, L., Engh, R. A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R. & Bossemeyer, D. (1997). Staurosporine-induced conformational changes of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit explain inhibitory potential. *Structure* **5**(12), 1627-37.
- Rauh, D., Klebe, G., Stürzebecher, J. & Stubbs, M. T. (2003). ZZ made EZ: Influence of inhibitor configuration on enzyme selectivity. *J. Mol. Biol.* **submitted**. (Abschnitt 3.2, Seite 39)
- Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G. & Stubbs, M. T. (2002). Trypsin mutants for structure-based drug design: expression, refolding and crystallisation. *Biological Chemistry* **383**(7/8), 1309-1314.
- Renatus, M., Bode, W., Huber, R., Stürzebecher, J., Prasa, D., Fischer, S., Kohnert, U. & Stubbs, M. T. (1997). Structural mapping of the active site specificity determinants of human tissue-type plasminogen activator. Implications for the design of low molecular weight substrates and inhibitors. *J Biol Chem* **272**(35), 21713-9.
- Renatus, M., Bode, W., Huber, R., Stürzebecher, J. & Stubbs, M. T. (1998). Structural and functional analyses of benzamidine-based inhibitors in complex with trypsin: implications for the inhibition of factor Xa, tPA, and urokinase. *J Med Chem* **41**(27), 5445-56.
- Reyda, S., Sohn, C., Klebe, G., Rall, K., Ullmann, D., Jakubke, H. D. & Stubbs, M. T. (2003). Reconstructing the binding site of factor Xa in trypsin reveals ligand-induced structural plasticity. *J Mol Biol* **325**(5), 963-77.
- Roberts, N. A. (1995). Drug-resistance patterns of saquinavir and other HIV proteinase inhibitors. *Aids* **9 Suppl 2**, 27-S32.
- Rosing, J., Tans, G., Govers-Riemslog, J. W. P., Zwaal, R. F. A & Hemker, H. C. (1980). The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J. Biol. Chem.* **255**, 274-283.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. (1996). *Folding proteins*. Practical Approach Series, Oxford University Press.

- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB* **35**(41), 49-55.
- Rühlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K. & Huber, R. (1973). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. *J Mol Biol* **77**(3), 417-36.
- Russell, R. B. & Eggleston, D. S. (2000). New roles for structure in biology and drug discovery. *Nat Struct Biol* **7 Suppl**, 928-30.
- Sanchez, R., Pieper, U., Melo, F., Eswar, N., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Mirkovic, N. & Sali, A. (2000). Protein structure modeling for structural genomics. *Nat Struct Biol* **7 Suppl**, 986-90.
- Schafferhans, A. & Klebe, G. (2001). Docking ligands onto binding site representations derived from proteins built by homology modelling. *J Mol Biol* **307**(1), 407-27.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**(2), 157-62.
- Shaw, K. J., Guilford, W. J., Dallas, J. L., Koovakkaat, S. K., McCarrick, M. A., Liang, A., Light, D. R. & Morrissey, M. M. (1998). (Z,Z)-2,7-Bis(4-amidinobenzylidene)cycloheptan-1-one: identification of a highly active inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J Med Chem* **41**(19), 3551-6.
- Shotton, D. M. & Hartley, B. S. (1970). Amino-acid sequence of porcine pancreatic elastase and its homologies with other serine proteinases. *Nature* **225**(235), 802-6.
- Sichler, K., Hopfner, K. P., Kopetzki, E., Huber, R., Bode, W. & Brandstetter, H. (2002). The influence of residue 190 in the S1 site of trypsin-like serine proteases on substrate selectivity is universally conserved. *FEBS Lett* **530**(1-3), 220-4.
- Sinha, N. K. & Light, A. (1975). Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on Agarose beads. *J. Biol. Chem.* **250**(22), 8624-9.
- Sleigh, S. H., Seavers, P. R., Wilkinson, A. J., Ladbury, J. E. & Tame, J. R. (1999). Crystallographic and calorimetric analysis of peptide binding to OppA protein. *J Mol Biol* **291**(2), 393-415.
- Sperl, S., Bergner, A., Stürzebecher, J., Magdolen, V., Bode, W. & Moroder, L. (2000a). Urethanyl-3-amidinophenylalanine derivatives as inhibitors of factor Xa. X-ray crystal structure of a trypsin/inhibitor complex and modeling studies. *Biol Chem* **381**(4), 321-9.

- Sperl, S., Jacob, U., Arroyo de Prada, N., Stürzebecher, J., Wilhelm, O. G., Bode, W., Magdolen, V., Huber, R. & Moroder, L. (2000b). (4-aminomethyl)phenylguanidine derivatives as nonpeptidic highly selective inhibitors of human urokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10), 5113-8.
- Stubbs, M. T. & Bauer, M. M. T. (1999). Crystallization conditions for proteinases. In *Proteolytic Enzymes* (Sterchi, E. & Stoecker, W., eds.), pp. 337-368. Springer Lab Manual, Heidelberg.
- Stubbs, M. T. & Bode, W. (1993). A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb Res* **69**(1), 1-58.
- Stubbs, M. T., Huber, R. & Bode, W. (1995). Crystal structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin: structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin. *FEBS Lett* **375**(1-2), 103-7.
- Stubbs, M. T., Reyda, S., Dullweber, F., Moller, M., Klebe, G., Dorsch, D., Mederski, W. W. & Wurziger, H. (2002). pH-dependent binding modes observed in trypsin crystals: lessons for structure-based drug design. *Chem.Bio.Chem.* **3**(2-3), 246-9.
- Stürzebecher, J., Markwardt, F., Voigt, B., Wagner, G. & Walsmann, P. (1983). Cyclic amides of N alpha-arylsulfonylaminoacylated 4- amidinophenylalanine--tight binding inhibitors of thrombin. *Thromb Res* **29**(6), 635-42.
- Stürzebecher, J., Prasa, D., Hauptmann, J., Vieweg, H. & Wikstrom, P. (1997). Synthesis and structure-activity relationships of potent thrombin inhibitors: piperazides of 3-amidinophenylalanine. *J Med Chem* **40**(19), 3091-9.
- Stürzebecher, J., Prasa, D., Wikstrom, P. & Vieweg, H. (1995). Structure-activity relationships of inhibitors derived from 3- amidinophenylalanine. *J Enzyme Inhib* **9**(1), 87-99.
- Stürzebecher, J., Stürzebecher, U., Vieweg, H., Wagner, G., Hauptmann, J. & Markwardt, F. (1989). Synthetic inhibitors of bovine factor Xa and thrombin comparison of their anticoagulant efficiency. *Thromb Res* **54**(3), 245-52.
- Thornton, J. M., Todd, A. E., Milburn, D., Borkakoti, N. & Orengo, C. A. (2000). From structure to function: approaches and limitations. *Nat Struct Biol* **7 Suppl**, 991-4.
- Urzhumtsev, A., Tete-Favier, F., Mitschler, A., Barbanton, J., Barth, P., Urzhumtseva, L., Biellmann, J. F., Podjarny, A. & Moras, D. (1997). A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure* **5**(5), 601-12.

- Venter, J. C., Adams, M. D. & Myers, E. W. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**(5507), 1304-51.
- von Itzstein, M., Wu, W. Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M. L., White, H. F., Oliver, S. W. & *et al.* (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**(6428), 418-23.
- Waghorn, S. L. & Goa, K. L. (1998). Zanamivir. *Drugs* **55**(5), 721-7.
- Wagner, G., Vieweg, H. & Horn, H. (1977). [Synthesis of alpha-alpha'-Bis-[amidinobenzylides]-and alpha-alpha'-Bis-[amidinobenzyl]-cycloalkanones]. *Pharmazie* **32**(3), 141-5.
- Walker, B. & Lynas, J. F. (2001). Strategies for the inhibition of serine proteases. *Cell Mol Life Sci* **58**(4), 596-624.
- West, M. L. & Fairlie, D. P. (1995). Targeting HIV-1 protease: a test of drug-design methodologies. *Trends Pharmacol Sci* **16**(2), 67-75.
- Whitlow, M., Arnaiz, D. O., Buckman, B. O., Davey, D. D., Griedel, B., Guilford, W. J., Koovakkat, S. K., Liang, A., Mohan, R., Phillips, G. B., Seto, M., Shaw, K. J., Xu, W., Zhao, Z., Light, D. R. & Morrissey, M. M. (1999). Crystallographic analysis of potent and selective factor Xa inhibitors complexed to bovine trypsin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**(Pt 8), 1395-404.
- Wilke, M. E., Higaki, J. N., Craik, C. S. & Fletterick, R. J. (1991). Crystal structure of rat trypsin-S195C at -150 degrees C. Analysis of low activity of recombinant and semisynthetic thiol proteases. *J Mol Biol* **219**(3), 511-23.
- Xie, Y. & Wetlaufer, D. B. (1996). Control of aggregation in protein refolding: the temperature-leap tactic. *Protein Science* **5**(3), 517-523.
- Zhao, Z., Arnaiz, D. O., Griedel, B., Sakata, S., Dallas, J. L., Whitlow, M., Trinh, L., Post, J., Liang, A., Morrissey, M. M. & Shaw, K. J. (2000). Design, synthesis, and in vitro biological activity of benzimidazole based factor Xa inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **10**(9), 963-6.
- Zündorf, I. & Dingermann, T. (2001). [Only when we know the enemy, can we correctly fight him. The structure of the HIV]. *Pharm Unserer Zeit* **30**(3), 202-7.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Überführung der Faktor Xa Bindetasche in Trypsin: Ein Modellsystem für das Verständnis von Protein – Ligand – Wechselwirkungen und zur Charakterisierung von Selektivitätsdeterminanten“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, im Februar 2003

Daniel Rauh

Lebenslauf

Daniel Rauh

Geburtstag:	03. August 1972
Geburtsort:	Frankfurt a. M.
1988 - 1993	Peter-Petersen-Schule Hamburg
Aug. 1990 - Juli 1991	Arlington High-School, Oregon, USA
Juni 1993	Allgemeine Hochschulreife
Juli 1993 - Okt. 1994	Bundesmarine, Flensburg. 12 Monate Grundwehrdienst, 3 Monate Anschlusswehrübung
Okt. 1994 - Okt. 1998	Studium der Pharmazie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Nov. 1998 - Juni 1999	Diplomarbeit mit dem Thema „Leitstrukturbasierende Synthese und in vitro-Tests neuer Trypsin-Inhibitoren“ am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-H. Otto
Juni 1999	Verleihung des akademischen Grades „Diplom-Pharmazeut“ der Universität Greifswald
Juni 1999 - Dez. 1999	Pharmaziepraktikant in der Bodden-Apotheke, Stralsund
Dez. 1999	Approbation als Apotheker
Dez. 1999 – Nov. 2002	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Klebe und Herrn Prof. Dr. M. T. Stubbs
Dez. 1999 – Dez. 2002	Stipendiat der DFG im Graduiertenkolleg „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“
Seit Jan. 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg